

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Βιοσυμβατότητα ρητινωδών υλικών αποκατάστασης για οδοντιατρική χρήση:
κυτταροτοξικότητα και ανίχνευση οργανικών συστατικών μετά από εκχύλιση σαράντα
ημερών με εφαρμογή GC/MS.

Ελισάβετ Κουλαουζίδου,
Οδοντίατρος, Αν. Καθηγήτρια Οδοντιατρικής ΑΠΘ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Λάρισα, Ιανουάριος 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Βιοσυμβατότητα ρητινωδών υλικών αποκατάστασης για οδοντιατρική χρήση:
κυτταροτοξικότητα και ανίχνευση οργανικών συστατικών μετά από εκχύλιση σαράντα
ημερών με εφαρμογή GC/MS.

Ελισάβετ Κουλαουζίδου
Οδοντίατρος, Αν. Καθηγήτρια Οδοντιατρικής ΑΠΘ
Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επιβλέπων: Καθηγητής Δημήτριος Κουρέτας

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης:
Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής
Ανδρέας Τσακάλωφ, Αν. Καθηγητής
Χριστίνα Τσιτσιμπίκου, Χημικός

Λάρισα, Ιανουάριος 2018

UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

POSTGRADUATE STUDIES
Master of Science: TOXICOLOGY

Biocompatibility of dental composites: Cytotoxicity and determination of organic eluates
by use of GC/MS over a period of forty days

Elisabeth Koulaouzidou
DDS, Assoc. Professor Dentistry
Master Thesis

Supervisor: Prof. Dimitrios Kouretas

Evaluation Committee:
Dimitrios Kouretas, Professor
Andreas Tsakalof, Assoc. Professor
Christina Tsitsimpikou, Chemist

Larisa, January 2018

Σε όλους όσους στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου τόσα χρόνια...

Ευχαριστώ για όλα...

Περίληψη

Τα οδοντιατρικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση των οδοντικών ιστών τα τελευταία χρόνια είναι κατά κύριο λόγο οι σύνθετες ρητίνες. Η χημική σύνθεσή τους αποτελείται από: οργανική φάση, ανόργανες ενισχυτικές ουσίες, συζευκτικό παράγοντα και άλλα πρόσθετα συστατικά σε μικρότερη αναλογία.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση οργανικών συστατικών που μπορεί να εκλυθούν από πέντε εμφρακτικά υλικά οπών και σχισμών με βάση τη ρητίνη με αέριο χρωματογραφία/ φασματομετρία μάζας (GC/MS) μετά από αποθήκευση έως 40 ημέρες και η μελέτη της επίδρασης των ίδιων υλικών στην επιβίωση κυττάρων σε *in vitro* καλλιέργειες ινοβλαστικών κυττάρων .

Τα υλικά που μελετήθηκαν ήταν: BeautiSealant (SHOFU), Clinpro (3M / ESPE), ConSeal F (SDI), Grandio Seal (VOCO) και Helioseal Clear (Ivoclar / Vivadent).

Τα οργανικά μονομερή που ανιχνεύθηκαν ήταν: Βουτυλιωμένο υδροξυ τολουόλιο (BHT), δις-φαινόλη-A (BPA), καμφοροκινόνη (CQ), διαιθυλενογλυκολοδιμεθακρυλικός εστέρας (DEGDMA), 4N, N-διμεθυλαμινοβενζοϊκός βουτυλαιθοξυ εστέρας (DMABEE), 2-υδροξυαιθυλμεθακρυλικός εστέρας (HEMA), διμεθακρυλικός εστέρας της τρι-αιθυλενο γλυκόλης (TEGDMA), τετραβουτυλ-τετραφθοροβορικό αμμώνιο (TBATPB), τριφαινυλοστιβάνιο (TPSb).

Κατασκευάστηκαν δίσκοι συγκεκριμένων διαστάσεων και βάρους από κάθε υλικό τα οποία μετά τον φωτοπολυμερισμό τους βυθίστηκαν σε διάλυμα καφεΐνης / μεθανόλης (0,1 mg / ml καφεΐνης / 1 ml μεθανόλης). Η καφεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Τα υλικά χωρίστηκαν σε ομάδες και αφέθηκαν σε επωαστήρα για 1 και 40 ημέρες.

Τα κύτταρα NIH/3T3 εκτέθηκαν στα πολυμερισμένα υλικά και η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε με ποσοτική τεχνική (μέτρηση ζωντανών κυττάρων) σε δύο χρόνους παρατήρησης (24 και 72 ώρες).

Η ανάλυση των εκλούμενων μονομερών πραγματοποιήθηκε σε συσκευή GC / MS (Clarus 500, Perkin Elmer). Η ταυτοποίηση βασίστηκε στη βιβλιοθήκη NIST, στο χρόνο απελευθέρωσης και στη βιβλιογραφία. Υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις των μονομερών που ανιχνεύθηκαν και των κυττάρων που επιβίωσαν. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό IBM SPSS statistics.

Τα υλικά που εξετάστηκαν παρουσίασαν διαφορές στον τύπο και το ποσοστό των συστατικών. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μονομερούς ανιχνεύθηκαν στις 40 ημέρες. Και στους δύο χρόνους ελέγχου το κύριο μονομερές που ανιχνεύθηκε ήταν TEGDMA ενώ τα BHT και DEGDMA ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η κυτταροτοξικότητα και η απελευθέρωση μονομερών από οδοντιατρικά υλικά σχισμών και σχισμών εξαρτάται από τον τύπο/σύνθεση του υλικού και το χρόνο παρατήρησης.

Η γνώση των επιπτώσεων των ρητινωδών οδοντιατρικών υλικών στον ανθρώπινο οργανισμό είναι απαραίτητη καθώς το ενδιαφέρον για την ασφάλεια της εφαρμογής τους στον πληθυσμό είναι αυξημένο .

Λέξεις-Κλειδιά: σύνθετες ρητίνες, αέρια χρωματογραφία/χρωματογραφία μάζας (GC/MS), τοξικότητα

Abstract

The aim of this study was to evaluate the leached organic components from five resin-based pit and fissure sealants using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) after 1 and 40 days storage and the effect of the resin-based pit and fissure sealants on cell survival.

The resin materials studied were: BeautiSealant (SHOFU), Clinpro (3M/ESPE), ConSeal F (SDI), Grandio Seal (VOCO) and Helioseal Clear (Ivoclar/Vivadent).

The following organic monomers were detected: Butylated hydroxytoluene (BHT), bis-phenol-A (BPA), camphoroquinone (CQ0), diethylenglycoldimethacrylate (DEGDMA), 4N, N-dimethylaminobenzoic acid butylethoxyester (DMABEE), hydroxyethylmethacrylate (HEMA), hydroquinone monomethylether (MEHQ), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), Tetrabutylammonium Tetrafluoroborate (TBATFB), Triphenylstibane (TPSb).

Disks were made of each material, polymerized and immersed in caffeine/methanol solution (0.1mg/ml caffeine/ 1ml of methanol). Caffeine was used as an internal standard. The materials were divided into groups and left in an incubator for 1 and 40 days.

NIH/3T3 cells were exposed to cured sealants and cell viability was assessed by a quantitative technique (cell counting) at two observation periods.

Analysis was performed on a GC/MS device (Clarus 500, Perkin Elmer). Identification was based on the NIST library, retention time and bibliography. Mean values and corresponding standard deviations of eluted substances and cell numbers were calculated. The statistical analysis of the results was performed with the IBM SPSS statistics software.

The tested materials showed differences in the type and percentage of eluted components. Higher monomer concentrations were detected at 40 days. At both control times the main monomer detected was TEGDMA whereas BHT and DEGDMA were detected at lower concentrations.

The cytotoxicity and the release of monomers from pit and fissure dental materials examined depends on the type of material and the observation time point. Since resin-based dental materials have raised public concerns about possible adverse biological

effects, it is essential to acknowledge if there are any effects of these materials on the human body.

Key words: dental resin composites; gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS); toxicity

Περιεχόμενα

Γενικό μέρος	σελ. 9
Ειδικό μέρος	σελ. 15
Αποτελέσματα	σελ. 18
Συζήτηση	σελ. 21
Βιβλιογραφία	σελ. 26
Πίνακες	σελ. 32-34
Σχήματα	σελ. 36-49

Γενικό μέρος

Στη σύγχρονη κλινική οδοντιατρική πράξη τα υλικά που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι σύνθετες ρητίνες. Οι κλινικές εφαρμογές τους καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα από εμφράξεις, συγκολλητικές κονίες, έμμεσες εμφράξεις, όψεις μεταλλικών αποκαταστάσεων μέχρι ενδορριζικούς άξονες και κολοβώματα.

Η σύνθεσή τους περιλαμβάνει:

- την οργανική πολυμερική μήτρα (organic resin matrix) που είναι η συνεχής φάση σε ποσοστό 15-35% του τελικού υλικού
- την ανόργανη φάση σε διασπορά που είναι οι ανόργανες ενισχυτικές ουσίες (fillers) σε ποσοστό 65-85% του υλικού
- ένα συζευκτικό παράγοντα (coupling agent)
- ένα σύστημα κατάλυσης με εκκινητές (initiators) με επιταχυντές (accelerators)
- χρωστικές (pigments)
- αναστολείς πολυμερισμού (inhibitors)
- σταθεροποιητές (stabilizers)

Τα μονομερή που συνδυάζονται στην οργανική μήτρα είναι διμεθακρυλικοί εστέρες. Το βασικό μονομερές είναι το Bis-GMA (διμεθακρυλικός εστέρας του διγλυκιδυλαιθέρα της διφαινόλης Α), που προέρχεται από την αντίδραση της διφαινόλης Α (bisphenol-A) και του γλυκιδυλικού μεθακρυλίου (glycidyl methacrylate). Η σύνθετη ρητίνη που περιέχει αυτό το μονομερές συνήθως αναφέρεται ως ρητίνη του Bowen επειδή πρώτος αυτός την ανακάλυψε το 1962. Το Bis-GMA διαθέτει πολύ μεγάλο ιξώδες και μεγάλο μοριακό βάρος με αποτέλεσμα η ενσωμάτωση των υπολοίπων συστατικών να γίνεται με δυσκολία αλλά και ο πολυμερισμός του να παρουσιάζει προβλήματα. Για να αντιμετωπιστεί αυτό στη σύνθεση των ρητινών προστίθενται και άλλα μονομερή (συμμονομερή-διαλύτες), όπως είναι το TEGDMA (διμεθακρυλικός εστέρας της τριαιθυλενο γλυκόλης). Η συνήθης αναλογία του TEGDMA στο τελικό προϊόν δεν πρέπει να υπερβαίνει στο 25%.

Το TEGDMA διαθέτει μικρό μοριακό βάρος με αποτέλεσμα να βελτιώνει το βαθμό πολυμερισμού και το ιξώδες. Στην προσπάθεια βελτίωσης των ιδιοτήτων των ρητινών χρησιμοποιούνται εναλλακτικά και άλλα βασικά μονομερή, όπως είναι το UDMA (διμεθακρυλική ουρεθάνη), BisEMA (διμεθακρυλικός εστέρας της αιθοξυλιωμένης

διφαινόλης) κά. τα οποία χρησιμοποιούνται σε διάφορες αναλογίες. Το UDMA έχει επίσης μεγάλο μοριακό βάρος αλλά δεν διαθέτει αρωματικούς δακτυλίους στη σύνθεσή του με αποτέλεσμα το μόριο του να είναι πιο ευκίνητο και με χαμηλότερο ιξώδες. Το BisEMA είναι παράγωγο του BisGMA, από το οποίο προκύπτει με απομάκρυνση των υδροξυλικών ομάδων και παρουσιάζει βελτιώσεις κυρίως ως προς την προσρόφηση νερού.

Οι ανόργανες ενισχυτικές ουσίες είναι ύαλοι διαφόρων τύπων, όπως κρυσταλλικός χαλαζίας, άμορφο και κολλοειδές πυρίτιο, βαριο-πυριτικές, βάριο-βοριο-πυριτικές, λίθιο-αργίλιο-πυριτικές, ζirkonio-πυριτικές, φθοριο-πυριτικές ύαλοι κά. Η προσθήκη τους συμβάλλει στη βελτίωση των φυσικών, μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών και στα αισθητικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το χρώμα, η διαφάνεια και ο φθορισμός.

Για τη σύνδεση των δύο διαφορετικών φάσεων (οργανική μήτρα και ανόργανη ενισχυτική φάση) χρησιμοποιείται ο συζευκτικός παράγοντας που διαθέτει δύο ενεργά άκρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα σταθερής σύνδεσης και με τις δύο φάσεις. Τέτοιες ενώσεις είναι διάφορα σιλάνια, όπως οργανοσιλάνια, γ-μεθακρυλοξυ-προπυλοτριαιθοξυσιλάνιο, φαινυλοτριμεθοξυσιλάνιο, φθοριοσιλάνιο κά.

Σαν εκκινητές του πολυμερισμού χρησιμοποιούνται υπεροξειδία, υδροξυπεροξειδία και αζωενώσεις που προσφέρουν τις ρίζες που απαιτούνται για τον πολυμερισμό. Στα υλικά που φωτοπολυμερίζονται ως εκκινητής χρησιμοποιείται κυρίως η καμφοροκινόνη που έχει χρώμα κίτρινο και απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 470nm.

Από το σύνολο των ρητινωδών υλικών που χρησιμοποιούνται σήμερα, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν υλικά που χρησιμοποιούνται ως εμφρακτικά οπών και σχισμών των δοντιών. Οι δύο κύριοι τύποι εμφρακτικών οπών και σχισμών έχουν σαν βάση τη ρητίνη ή την υαλοϊονομερή κονία (Ahonuo-Saloranta και Forss 2013). Εντούτοις, τα υλικά με βάση τη ρητίνη προτιμούνται από τους κλινικούς ιατρούς επειδή είναι πιο εύκολα στην κλινική εφαρμογή τους (Geurtsen και συν. 1999).

Η χρήση των εμφρακτικών οπών και σχισμών είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την πρόληψη της τερηδόνας σε παιδιά και εφήβους (Simonsen 1991, Llodra και συν. 1993, Beiruti και συν. 2006 Ahonuo-Saloranta και Forss 2013). Ο όρος "εμφρακτικό οπών και σχισμών" αναφέρεται σε «ένα χημικά ενεργό υγρό/ρευστό υλικό το οποίο εισάγεται στις οπές και των σχισμές σε δόντια ευαίσθητα στην τερηδόνα, και μετά την εφαρμογή του σκληρύνεται είτε μέσω χημικού πολυμερισμού (αυτοπολυμεριζόμενο) είτε με την

επίδραση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος (φωτοπολυμεριζόμενο)» (Simonsen και Neal 2011). Οι ερευνητές Simonsen και Neal αναφέρουν ότι τα βακτηρίδια που παράγουν τερηδόνα θα πρέπει να απομακρυνθούν από την πηγή των θρεπτικών τους συστατικών (Simonsen και Neal 2011).

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται σε εμφρακτικά οπών και σχισμών είναι διμεθακρυλικά, όπως Bis-GMA και παράγωγα Bis-GMA (Komurcuoglu και συν., 2005). Αυτό το μονομερές συν-πολυμερίζεται συνήθως με το άλλο κύριο μονομερές, το TEGDMA. Άλλες κύριες ενώσεις που περιέχονται είναι το UDMA, το βενζοϋλοϋπεροξειδίο και οι μεθυλομεθακρυλικοί εστέρες (Müller και συν. 1997, Geurtsen και συν. 1999, Moon και συν. 2000) (Müller και συν. 1997). Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού των υλικών τα Bis-GMA, UDMA και TEGDMA σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δικτυακή δομή (Geurtsen και συν. 1999, Moon και συν. 2000). Καθώς η διασύνδεση προχωρά, η διάχυση μέσα στο τρισδιάστατο δίκτυο μειώνεται, επομένως δεν είναι εφικτός ο πλήρης πολυμερισμός (Michelsen και συν. 2007). Ο μη πλήρης πολυμερισμός είναι ένας παράγοντας απελευθέρωσης μονομερών στην οποία σημαντικό ρόλο παίζει η σύνθεση της οργανικής μήτρας.

Γενικά, η απελευθέρωση συστατικών ακολουθεί δύο διαδρομές: πρώτον τη βραχυπρόθεσμη απελευθέρωση λόγω μετατροπής μονομερούς-πολυμερούς και δεύτερον την απελευθέρωση λόγω διάβρωσης και αποδόμησης (Polydoru 2018). Η σύνθεση και η ποσότητα των εκλούμενων συστατικών εξαρτώνται από τη σύνθεση του υλικού ρητίνης, το μοριακό βάρος και την υδροφιλικότητα και το χρησιμοποιούμενο διάλυμα εκχύλισης (Al-Hiyasat και συν. 2004, Sideridou και Achilias 2005). Τα απομένοντα μονομερή και τα πρόσθετα που δεν συνδέονται με το δίκτυο είναι ελεύθερα να απελευθερωθούν στην στοματική κοιλότητα (Michelsen και συν. 2007). Επιπλέον, τα πρόσθετα σωματίδια, που περιέχονται σε ορισμένα υλικά, συσχετίζονται με την έκλυση μονομερών (Lempel και συν. 2016). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο βαθμός μετατροπής κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμερισμού επηρεάζει την ποσότητα των εκλούμενων μονομερών, αλλά δεν είναι η μοναδική παράμετρος που τελικά το καθορίζει (Polydoru 2018). Το μοριακό βάρος και η υδροφοβικότητα των ουσιών, καθώς και η πολυπλοκότητα του δικτύου επηρεάζουν την έκλυση μονομερών (Polydoru 2018). Η έκταση της αντίδρασης πολυμερισμού, η χημεία του διαλύτη και η πολικότητα των διαλυτών, το μέγεθος και η χημική σύνθεση των εκλούμενων ουσιών

επηρεάζουν τη διαδικασία έκλουσης από τις σύνθετες ρητίνες (Komurcuoglu και συν. 2005) ενώ παράλληλα το πορώδες του υλικού και το πάχος των δειγμάτων έχουν επίσης σημασία (Ferracane 1994, Nathanson και συν. 1997). Οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη, είναι διαλύτες που προσομοιάζουν τις στοματικές συνθήκες (Ruyter 1981, Yoshida και συν. 1992). Σύμφωνα με στοιχεία της βιβλιογραφίας η έκλουση των μονομερών σχεδόν ολοκληρώνεται στις πρώτες 24 ώρες, αλλά σύμφωνα με άλλους ερευνητές η μεγαλύτερη απελευθέρωση παρατηρείται την πρώτη εβδομάδα (Tanaka και συν. 1991, Rongrgueksa και συν. 2015) και μερικές μελέτες δηλώνουν ότι η έκλουση μονομερών μπορεί να συνεχιστεί και για περίοδο 30 ημερών (Polydoru και συν. 2009, 2012, Manojlovic και συν. 2011). Μετά τις πρώτες 24 ώρες η έκλουση μονομερών απαιτεί επιπλέον χρόνο ώστε η αλυσίδα του πολυμερούς να διογκωθεί και να προκύψει περαιτέρω έκλουση (Polydoru 2018). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η έκλουση μονομερών μετά τον πολυμερισμό επηρεάζεται από διαλύτες που βρίσκονται στη στοματική κοιλότητα (Polydoru 2018) και την αποδόμηση που προκαλείται από ενζυματική κατάλυση ή υδρόλυση (Görferich 1996)

Διάφοροι διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για τον προσδιορισμό της έκλουσης μονομερών όπως απεσταγμένο νερό (Rothmund και συν. 2015), σάλιο (Michelsen και συν., 2007), διάλυμα Ringer (Michelsen και συν. 2007), αιθανόλη (Manabe 2000), Michelsen και συν., 2007) και μεθανόλη (Seiss και συν. 2009, Furcher και συν. 2013). Οι οργανικοί διαλύτες έχουν τη δυνατότητα να διεισδύσουν στην οργανική μήτρα ευκολότερα από άλλα διαλύματα, όπως π.χ. νερό, επομένως αναμένεται μεγαλύτερη έκλουση (Polydoru 2018). Λόγω της διείσδυσης των διαλυτών στην οργανική μήτρα οι πολυμερείς αλυσίδες θραύονται / ανοίγουν και τα μονομερή που δεν έχουν αντιδράσει διαχέονται (Σιδερίδου και Αχιλιάς 2005). Αυτό το γεγονός μαλακώνει τη μήτρα, γεγονός που επιτρέπει στον διαλύτη να διεισδύσει βαθύτερα και να συνεχιστεί περαιτέρω αυτή η διαδικασία (Finer και Santerre 2004, Finer και συν. 2004).

Σύμφωνα με τα παραπάνω με τους οργανικούς διαλύτες προσομοιώνεται η αποδόμηση και η διάβρωση των ρητινών (Polydoru 2018). Όσον αφορά το μέγεθος και τη χημική σύνθεση των εκλουόμενων ουσιών, τα μικρότερα μόρια αναμένεται να εκλουθούν ευκολότερα και με ταχύτερο ρυθμό από τα μεγαλύτερα ογκώδη μόρια (Ferracane 1994). Προκειμένου να προσδιοριστούν οι ενώσεις που μπορούν να εκλουστούν από

υλικό ρητίνης, προτείνονται διάφορες αναλυτικές μέθοδοι. Όλες οι μέθοδοι φαίνεται να είναι κατάλληλες για τον εντοπισμό των εκλούμενων μονομερών, αλλά υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά το μοριακό βάρος των εκλούμενων ουσιών, την ταυτοποίηση των υποπροϊόντων και των προϊόντων αποδόμησης και την ποσοτικοποίηση των ουσιών.

Τα μονομερή μεγάλου μοριακού μεγέθους κατά προτίμηση ανιχνεύονται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) ή φασματομετρίας μάζας HPLC (HPLC / MS) (Durner και συν. 2015). Γενικά, η HPLC εφαρμόζεται για την ανίχνευση βασικών μονομερών όπως Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA (Geurtsen και συν. 1999, Durner και συν. 2015).

Από την άλλη πλευρά, η αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση προσθέτων, μικρότερων μονομερών, συνμονομερών και άλλων πτητικών ενώσεων (Sprahl και συν. 1998), προϊόντων αποσύνθεσης και κατακερματισμού (Polydorou 2018).

Η απελευθέρωση μονομερών και προϊόντων αποδόμησης από τα εμφρακτικά οπών και σχισμών στη στοματική κοιλότητα δημιουργεί ανησυχίες για τη βιοσυμβατότητα και την τοξικότητά τους (Seiss και συν. 2009). Ορισμένα από τα συστατικά των ρητινωδών υλικών εμφανίζουν κυτταροτοξικές δράσεις (Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC 1990, Bouillaguet και συν. 1996, Heil και συν. 1996, Geurtsen και συν. 1999, Schweikl και συν. (Hetten και συν. 2005) ή μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις (Hensten-Pettersen 1998, Ortengren και συν. 1999). Επιπλέον, μερικές από αυτές παρουσιάζουν οιστρογονική δραστηριότητα (Olea και συν. 1996, Lewis και συν. 1999). Τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα των εκλούμενων ουσιών έχουν μελετηθεί με δοκιμές που εκτιμούν τη βλάβη στο ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), το επίπεδο γλουταθειόνης στα κύτταρα και την αποπτωτική τους δράση (Małkiewicz και συν. 2017). Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των οδοντικών υλικών σε πληθυσμούς κυττάρων προσομοιώνει τις στοματικές συνθήκες (Małkiewicz και συν. 2017). Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι ινοβλάστες των ούλων, τα κύτταρα της κερατίνης στοιβάδας του στοματικού επιθηλίου και τα τυποποιημένα στελέχη ινοβλαστών L929 και 3T3 ποντικού (Polydorou 2018). Η σύνθεση των εμφρακτικών οπών και σχισμών παρουσιάζει διαφορές από άλλα πολυμερή υλικά καθώς τα υλικά οπών και σχισμών περιέχουν περισσότερη μήτρα ρητίνης και λιγότερες ενισχυτικές ουσίες. Η εφαρμογή αυτών των υλικών σε μικρότερες

ηλικιακές ομάδες (το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών που θεραπεύονται με υλικά οπών και σχισμών είναι παιδιά και έφηβοι) είναι επίσης ένα στοιχείο προσοχής και ευαισθησίας. Συνεπώς η αξιολόγηση των υπολειμματικών μονομερών στα υλικά οπών και σχισμών είναι αναγκαία (Tarumi και συν. 2000, Komurcuoglu και συν. 2005).

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι αφενός η μακροπρόθεσμη αξιολόγηση των εκλουόμενων οργανικών συστατικών από πέντε σύγχρονα εμφρακτικά υλικά οπών και σχισμών με τη χρήση GC/MS και αφετέρου η εκτίμηση της επίδρασής τους στην επιβίωση κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια. Η μηδενική υπόθεση εργασίας ήταν ότι τα πέντε υλικά δεν εμφανίζουν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές ως προς τα συστατικά που εκλούνται και ως προς την κυτταροτοξικότητά τους.

Ειδικό μέρος

Υλικά, εξοπλισμός και μέθοδοι

Προετοιμασία υλικών και δειγμάτων

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε εμπορικά διαθέσιμα εμφρακτικά οπών και σχισμών: BeautiSealant (SHOFU), Clinpro (3M / ESPE), Conseal F (SDI), Grandio Seal (VOCO) και Helioseal Clear (Ivoclar / Vivadent).

Αναλυτικά, η σύνθεση τους σύμφωνα με τους κατασκευαστές παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Τα δείγματα ετοιμάστηκαν σε μήτρες τεφλόν που πληρώθηκαν με 100 mg μη σκληρυμένου υλικού για την παραγωγή δοκιμών με διάμετρο 6 mm και πάχος 2 mm. Τα δοκίμια πολυμερίστηκαν με συσκευή φωτός LED (Bluephase style, Ivoclar/Vivadent). Το φως εφαρμόστηκε σε σταθερή απόσταση από την επιφάνεια των δειγμάτων. Τα δείγματα πολυμερίστηκαν για 20 δευτερόλεπτα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ισχύς του φωτός LED κυμαινόταν σε ένα εύρος 1100-1400 mW / cm², όπως μετρήθηκε με ειδικό μετρητή ισχύος. Από κάθε υλικό και για κάθε χρόνο ελέγχου προετοιμάστηκαν οκτώ δοκίμια.

Εκτίμηση έκλυσης μονομερών

Ετοιμάστηκαν δύο σειρές από γυάλινους σωλήνες που περιείχαν διάλυμα 1 ml μεθανόλης (μεθανόλη, καθαρότητας HPLC 99,9%, CHEM-LAB) και 0,1 mg/ml καφεΐνης (καφεΐνη 99%, Alfa Aesar) ως εσωτερικό πρότυπο. Τα δοκίμια αποκολλήθηκαν από τις μήτρες/καλούπια και τα δείγματα κάθε υλικού εμβαπτίστηκαν αμέσως σε μεθανόλη σε χωριστούς γυάλινους σωλήνες. Οι γυάλινες σωλήνες ασφαλίστηκαν με πλαστικό πώμα για να αποφευχθεί η εξάτμιση. Τα μισά δείγματα διατηρήθηκαν σε επωαστήρα στους 37 ° C για 24 ώρες ενώ το άλλα μισά παρέμειναν για περίοδο 40 ημερών. Μετά από 24 ώρες και 40 ημέρες αντίστοιχα, 1 ml από κάθε διάλυμα μεθανόλης μεταφέρθηκε σε ξεχωριστά φιαλίδια GC και εγχύθηκε στον αέριο χρωματογράφο.

Διαχωρισμός με αεριοχρωματογραφία (GC)

Οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση συνδυασμού αερίου χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC / MS Clarus 500, Perkin Elmer). Ο αέριος χρωματογράφος διέθετε αυτόματο δειγματολήπτη και η τριχοειδική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν DB-5-MS (30m, 0,25 mm id., film Agilent 0,25 μm). Ο εισαγωγέας (διαχωρισμός 1:20) διατηρήθηκε στους 250° C. Η αρχική θερμοκρασία του θερμοστατούμενου κλιβάνου ήταν σταθερή για 2 λεπτά στους 50°C, στη συνέχεια αυξήθηκε με ρυθμό 10°C / min στους 300°C όπου παρέμεινε σταθερή για διάστημα 5 λεπτών. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο 5% με σταθερό ρυθμό ροής 1 κ.εκ. / λεπτό. Η γραμμή μεταφοράς από GC σε MS είχε ρυθμιστεί σε 310°C. Το φασματόμετρο μάζας λειτουργούσε σε λειτουργία ιονισμού ηλεκτρονίων, ο βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια (E.I.) χρησιμοποιήθηκε για ιονισμό στο φασματόμετρο μάζας, ενώ η πηγή ιόντων λειτουργούσε στους 220 ° C. Μόνο θετικά ιόντα σαρώθηκαν. Η σύριγγα ξεπλένονταν 2 φορές πριν και μετά την έγχυση.

Ανίχνευση φασματομετρίας μάζας (MS)

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έγιναν με τη χρήση φασματόμετρου μάζας σε πλήρη σάρωση (50 έως 450 m/z και ρυθμό ανίχνευσης 0,2 ανά δευτερόλεπτο). Η αναγνώριση των διαφορετικών ενώσεων στη συνέχεια βασίστηκε στη σύγκριση των ληφθέντων φασμάτων πλήρους σάρωσης ανάλογα με φάσματα που βρίσκονται στη βιβλιοθήκη NIST (Εθνικό Ινστιτούτο Επιστήμης και Τεχνολογίας, Gaithersburg, MD, ΗΠΑ), τον χρόνο απελευθέρωσης και στοιχεία της βιβλιογραφίας. Η καφεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο και αναλύθηκε με την αναλογία m/z=194. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η αντίστοιχη κορυφή κάθε ένωσης κανονικοποιήθηκε στην κορυφή της καφεΐνης.

Δείγματα που περιείχαν μόνο καφεΐνη (μάρτυρες) διαλυμένα σε μεθανόλη αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί ότι όλοι οι αναλυτές λειτούργησαν σωστά. Μεθανόλη εγχύθηκε μεταξύ καθενός από τα δείγματα σε όλες τις σειρές δειγμάτων από κάθε υλικό και αναλύθηκε με GC/MS για να ελεγχθεί εάν υπήρξαν επιδράσεις μεταφοράς κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Πειράματα κυτταρικών καλλιιεργειών

Ινοβλάστες NIH/3T3 εμβρύου ποντικού αναπτύχθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm² στους 37 ° C σε ατμόσφαιρα με 5% CO₂ και σχετική υγρασία 100%. Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια ήταν Dublecco Eagle (DMEM, Life, NY, USA) συμπληρωμένο με 10% βόειο ορό και αντιβιοτικά (100 IU / mL πενικιλίνη και 100 mg / mL στρεπτομυκίνη).

Τα εμφρακτικά υλικά οπών και σχισμών παρασκευάστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και 25-100 mg από κάθε υλικό τοποθετήθηκαν στο κέντρο των δίσκων (τρυβλίων) κυτταρικής καλλιέργειας των 6 mm (Costar Corning USA). Τα εμφρακτικά υλικά πολυμερίστηκαν με φως όπως περιγράφηκε προηγουμένως και αφέθηκαν για 24 ώρες υπό υπεριώδες φως για να αποφευχθεί μόλυνση. Κάθε δίσκος καλύφθηκε με 5 ml κυτταρικού αιωρήματος σε συγκέντρωση 20000 κυττάρων / mL. Οι κυτταροκαλλιέργειες χωρίς υλικά δοκιμής χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Για κάθε υλικό και κάθε χρονική περίοδο, προετοιμάστηκαν έξι τρυβλία. Όλες οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 ° C και οι περίοδοι επώασης ήταν 24 ώρες και 72 ώρες. Στο τέλος κάθε περιόδου επώασης το μέσο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν σε κάθε δίσκο 0,5 ml θρυψίνης 0,25% (β/ο) σε NaCl ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS) για αποκόλληση των κυττάρων. Το κυτταρικό εναιώρημα στο τρυβλίο αναμίχθηκε με 2,5 mL DMEM και 0,5 mL PBS με 0,25% (β / ο) trypan blue (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ΗΠΑ) για τη χρώση των κυττάρων που ήταν ζωντανά. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετρήθηκε με τη μέθοδο αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου σε αιμοκυτταρομετρητή (Newbauer Improved Bright-line, HBG, Western Germany). Τα βιώσιμα κύτταρα μετρήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στα δείγματα ελέγχου υπολογίστηκε ως ποσοστό χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\text{Ποσοστό βιώσιμων κυττάρων} = N_t / N_c \times 100$$

Όπου N_t είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων στα πειραματικά τρυβλία και N_c είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων στα τρυβλία μάρτυρες (control) .

Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Στατιστικές μέθοδοι

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με σχετικές τυπικές αποκλίσεις. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό IBM SPSS statistics και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p < 0,05$.

Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη η μηδενική υπόθεση εργασίας απορρίφθηκε. Σε όλα τα διαλύματα μεθανόλης ανιχνεύθηκαν διάφορα μονομερή και στους δύο χρόνους ελέγχου (1 και 40 ημέρες) (Πίνακας 2, Σχήματα 1-3). Οι χημικοί τύποι των διαφόρων συστατικών παρουσιάζονται στα Σχήματα 4-16. Το κύριο μονομερές που βρέθηκε σε όλα τα υλικά και σε όλες τις συνθήκες του πειράματος ήταν το TEGDMA.

Τα συστατικά που ανιχνεύθηκαν μετά από 1 ημέρα ήταν τα ακόλουθα: BHT, BPA, CQ, DEGDMA, EGDMA, HEMA, MEHQ, και TEGDMA. Τα CQ, DEGDMA και TEGDMA βρέθηκαν στα διαλύματα όλων των υλικών, ενώ το BHT δεν βρέθηκε στο BeautiSealant. Επιπλέον, τα MEHQ, EGDMA και DMABEE βρέθηκαν σε τρία από τα υλικά που δοκιμάστηκαν (Clinpro, Grandio Seal, Heliaseal Clear) ενώ HEMA απελευθερώθηκε από δύο υλικά (Conseal f, BeautiSealant). Τέλος μόνο από το υλικό Clinpro ανιχνεύθηκε τετραφθοροβορικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBATFB) και τριφαινυλοστανθίνη (Σχήμα 17). Από το Conseal f, το TEGDMA% CF ήταν 330,58 σε 1 ημέρα και 674,46 στις 40 ημέρες (διαφορά στατιστικά σημαντική $p < 0,05$) (Σχήμα 18). Στα άλλα τρία υλικά η διαφορά στη συγκέντρωση TEGDMA σε 1 και 40 ημέρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$) (Σχήματα 19-21). Στο υλικό BeautiSealant η συγκέντρωση του TEGDMA ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις 40 ημέρες από ότι την 1 ημέρα (διαφορά στατιστικά σημαντική $p < 0,05$) (Σχήμα 21).

Τα υπόλοιπα συστατικά έδειξαν αύξηση της συγκεντρώσεώς τους σε % CF σε όλα τα υλικά στον χρόνο ελέγχου των 40 ημερών. Μετά από 24 ώρες απελευθερώθηκε BHT από 4 υλικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις και στις 40 ημέρες απελευθερώθηκε από όλα τα υλικά σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ένας δεύτερος αναστολέας, το MEHO ανιχνεύθηκε σε τρία υλικά (Conseal f, Heliaseal Clear, BeautiSealant). Το Beautisealant έδειξε την υψηλότερη συγκέντρωση σε MEHQ, ενώ μικρές ποσότητες MEHQ ανιχνεύθηκαν σε Conseal f και Heliaseal Clear.

Το μονομερές HEMA απελευθερώθηκε επίσης από τα Conseal f και BeautiSealant. Στο Conseal f, η % CF ήταν 253,48 την πρώτη ημέρα και 674,54 μετά από 40 ημέρες (διαφορά στατιστικά σημαντική $p < 0,05$). Αντίθετα από το BeautiSealant, το % CF μετά

από μία ημέρα ήταν 572,14 και μετά από 40 ημέρες 266,77 (διαφορά στατιστικά σημαντική σε $p < 0,05$).

Η BPA ανιχνεύθηκε στο Helioseal Clear σε 22,58% CF μετά από μία ημέρα και 7,96% CF μετά από σαράντα ημέρες (διαφορά στατιστικά σημαντική $p < 0,05$). Η BPA ανιχνεύθηκε ακόμη και στο Conseal f σε 40 ημέρες ελέγχου σε συγκέντρωση 3,83% CF. Τέλος, μόνο από το υλικό Clinpro απελευθερώθηκαν τετραθοροβορικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBATFB) και τριφαινυλστιβάνιο (TPSb) και στους δύο χρόνους παρακολούθησης. Η συγκέντρωση του TBATFB για την πρώτη ημέρα ήταν 204,4% CF και 1051,64% CF για τις σαράντα ημέρες (στατιστικά σημαντική διαφορά, $p < 0,05$). Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε επίσης και στο TPSb, μεταξύ των δύο χρόνων ελέγχου.

Τα αποτελέσματα από το πείραμα κυτταροτοξικότητας έδειξαν ότι το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας στις 24h και 72h ήταν μικρότερο από ό,τι στους αρνητικούς μάρτυρες και η επίδραση ήταν εξαρτώμενη από το χρόνο. Τα τρία από τα πέντε υλικά της μελέτης (Beautisalan, Clinpro και Grandioseal) έδειξαν τη μεγαλύτερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και στους δύο χρόνους παρατήρησης. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του Helioseal Clear και του Conseal F.

Τα συνοπτικά αποτελέσματα του πειράματος της κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και στα Σχήματα 22-23.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν αρκετά μονομερή με τη χρήση GC/MS μετά από εκχύλιση των πέντε υλικών σε διάλυμα μεθανόλης. Το κύριο μονομερές που ανιχνεύθηκε ήταν το TEGDMA σε όλα τα υλικά και στους δυο χρόνους παρατήρησης. Το TEGDMA είναι ένα συνήθως χρησιμοποιούμενο συμμονομερές (Müller και συν., 1997, Geurtsen et al., 1999, Rothmund et al., 2015). Σύμφωνα με τα δελτία ασφαλείας (MSDS) των υλικών που περιλαμβάνονται στη μελέτη οι συγκεντρώσεις του TEGDMA του κατασκευαστή κυμάνθηκαν μεταξύ 10-50% κατά βάρος. Το TEGDMA, όπως ήδη αναφέρθηκε, προστίθεται στη σύνθεση της ρητίνης ως συμμονομερές για να αυξηθεί ο βαθμός πολυμερισμού στη μήτρα ρητίνης (Müller και συν., 1997) ενώ θεωρείται ότι είναι κυτταροτοξικό για τον οδοντικό πολφό και τους ινοβλάστες των ούλων του ανθρώπου (Furche και συν. 2013). Επιπρόσθετα, μπορεί να επιδείξει αλλεργιογόνο ή γενotoξική δράση (Seiss και συν. 2009). Η αυξημένη έκλυση του TEGDMA στο Con Seal f μπορεί να εξηγηθεί αφού ο οργανικός διαλύτης διεισδύει βαθύτερα στο τρισδιάστατο δίκτυο επιτρέποντας την απελευθέρωση μεγαλύτερων ποσοτήτων μονομερών (Moon κ.ά., 2000, Cebé και συν. 2015, Furche και συν. 2013, Rothmund και συν. 2015). Επιπλέον, το TEGDMA μπορεί να διασπαστεί σε μικρότερα μονομερή, ερμηνεύοντας έτσι τη μείωση της συγκέντρωσης TEGDMA στις 40 ημέρες από του υλικό BeautiSealant (Gerzina και Hume 1994). Γενικά, καθώς η ποσότητα του TEGDMA διαφέρει ανάλογα με τον κατασκευαστή στη σύνθεση των προϊόντων, αναμένεται ότι θα υπάρξουν διακυμάνσεις και στην έκλυσή του.

Τα υλικά που στη μελέτη παρουσίασαν μεγάλα ποσοστά έκλυσης TEGDMA παρουσίασαν και μικρή επιβίωση των κυττάρων

Η καμφοροκινόνη CQ είναι ένας φωτοεκκινητής που απορροφά ένα ευρύ φάσμα μήκους κύματος και συνήθως χρησιμοποιείται με έναν συνεκκινητή (Van Landuyt και συν., 2007). Ενεργοποιείται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών προκειμένου να ξεκινήσει η αντίδραση πολυμερισμού (Michelsen και συν., 2003). Η CQ έχει βρεθεί ότι είναι γενotoξική (Heil και συν., 1996 · Li και συν., 2007) και πιθανώς αλλεργιογόνος (Malanin 1993). CQ και / ή ισομερή CQ εκλούστηκαν από όλα τα υλικά και στους δύο χρόνους ελέγχου. Την πρώτη ημέρα, η υψηλότερη συγκέντρωση CQ βρέθηκε στο Beautisealant, ενώ η χαμηλότερη στο Helioseal. Τα υλικά Clinpro και Con Seal f έδειξαν

σχεδόν την ίδια συγκέντρωση σε εκλούσιμη CQ. Μετά από μια περίοδο 40 ημερών οι συγκεντρώσεις της CQ αυξήθηκαν σημαντικά σε όλα τα υλικά εκτός από το GrandioSeal. Η αυξημένη έκλυση CQ με την πάροδο του χρόνου σε διάλυμα μεθανόλης αναφέρεται και από τους Furcht και συν. (2013) όμως για διαφορετικά υλικά.

Προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδραση πολυμερισμού κατά την αποθήκευση και την εφαρμογή των ρητινών, στα υλικά προστίθεται ένας αναστολέας πολυμερισμού. Στη μελέτη μας ως τέτοιο συστατικό ανιχνεύθηκε το BHT. Έχει αναφερθεί ότι το BHT προκαλεί τοξικότητα των ηπατικών κυττάρων (Seiss και συν., 2009) και αλλεργικές αντιδράσεις (Yamaki και συν., 2007). Επιπλέον, σε τρία από τα εξεταζόμενα υλικά ταυτοποιήθηκε η παρουσία ενός δεύτερου αναστολέα, του MEHQ. Ανάλογα ευρήματα αναφέρονται από τους Michelsen και συν. 2003, και 2007. Το BHT είναι μια υδρόφοβη ουσία, ενώ το MEHQ υδρόφιλη (Van Landuyt και συν. 2007). Αυτή η διαφορά στην υδροφιλικότητα ίσως είναι ο λόγος για τον οποίο οι δυο αναστολείς ανιχνεύθηκαν σε τρία υλικά.

Το DMABEE είναι ένας συνεκκινητής που χρησιμοποιείται συνήθως με την CQ που είναι ο κύριος εκκινητής (Michelsen και συν., 2003). Έχει αναφερθεί ότι το DMABEE μπορεί να επιδείξει κυτταροτοξικές επιδράσεις και διάσπαση της ακεραιότητας της μεμβράνης (Geurtsen et al., 1999, B. G. Sletten and Dahl 2000). Οι Moin Jan et al. 2001 αναφέρουν ότι το DMABEE μπορεί να συνδεθεί με το δίκτυο κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, ενώ η CQ είναι ελεύθερη να διέλθει από τη μήτρα ρητίνης. Ως αποτέλεσμα, αναμένεται να βρεθεί μικρότερη ποσότητα εκλυμάτων DMABEE από την CQ (Moin Jan και συν., 2001). Αντίθετα, στη μελέτη μας το DMABEE εκλούστηκε από Clinpro, Grandioseal και Helioseal και οι ανιχνευθείσες ποσότητες DMABEE ήταν πολύ υψηλότερες από τις ποσότητες CQ. Επιπλέον, μετά από μια περίοδο 40 ημερών οι συγκεντρώσεις του DMABEE ήταν απροσδόκητα υψηλότερες από ό, τι μετά από 24 ώρες.

Το DEGDMA είναι επίσης ένα συμμοномерές που εκλούστηκε από όλα τα εξεταζόμενα υλικά, αλλά σε συγκεντρώσεις που ήταν πολύ χαμηλές και στους δύο χρόνους ελέγχου. Στις σύνθετες ρητίνες ένα άλλο συνηθισμένο συμμοномерές που απαντάται ως έκλυμα είναι το μικρού μοριακού βάρους μονομερές HEMA (Rothmund και συν. 2015), του οποίου η χρήση έχει περιοριστεί στα σύγχρονα σκευάσματα. Το HEMA σχετίζεται με αλλεργιογόνο δράση (Van Landuyt και συν. 2007), κυτταροτοξικές και γονιδοτοξικές επιδράσεις (Gallorini και συν. 2014) και παρατεταμένη συσσώρευση αποπτωτικών

κυττάρων (Becher και συν. 2006). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το ανιχνευόμενο HEMA μπορεί να είναι ένα προϊόν αποδόμησης από το UDMA (Michelsen και συν., 2007 Cebe και συν. 2015) ή να αποτελεί μέρος της μήτρας οργανικής ρητίνης (Polydorou 2018). Στη μελέτη μας απελευθερώθηκε HEMA από δύο από τα υλικά που εξετάστηκαν, Con Seal f και BeautiSealant, τα οποία σύμφωνα με τα δελτία ασφαλείας των κατασκευαστών τους περιέχουν στη σύνθεσή τους UDMA.

Το μικρού μοριακού βάρους συμμενομερές EGDMA απελευθερώθηκε από Grandioseal, Helioseal Clear και BeautiSealant στο μέσο εκχύλισης σε διάφορες ποσότητες μετά από 24 ώρες. Σε αυτό τον χρόνο ελέγχου, από το Grandioseal ανιχνεύθηκε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση EGDMA, ενώ από το Helioseal Clear χαμηλότερη συγκέντρωση. Ωστόσο, μετά από 40 ημέρες, το EGDMA ανιχνεύθηκε επίσης από το Clinpro. Οι συγκεντρώσεις EGDMA στο χρόνο ελέγχου των 40 ημερών ήταν σημαντικά υψηλότερες για όλα τα υλικά, ειδικά για το BeautiSealant ενώ από το υλικό Con Seal f δεν βρέθηκε EGDMA. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το EGDMA μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό και την εξέλιξη των τερηδονικών βλαβών, καθώς θα μπορούσε να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των τερηδογονών μικροοργανισμών (Hansel και συν., 1998).

Το BPA χρησιμοποιείται συνήθως ως υλικό επαφής με τα τρόφιμα και μπορεί να βρεθεί σε δοχεία τροφίμων ή άλλες συσκευασίες (Kopieczna και συν., 2015). Στην οδοντιατρική η BPA χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σύνθεσης μονομερών μήτρας, όπως τα μονομερή του διμεθακρυλικού που χρησιμοποιούνται στις σύνθετες ρητίνες αλλά και στα εμφρακτικά οπών και σχισμών (Azarpazhooh and Main 2008). Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, το BPA μπορεί να μην αντιδράσει με το δίκτυο, αλλά να παραμένει μέσα στο υλικό, έτσι ώστε να μπορεί εύκολα να απελευθερωθεί όταν το υλικό βυθίζεται σε νερό ή σε οργανικούς διαλύτες (Suzuki και συν., 2000). Έτσι η έκλυση της BPA μπορεί να προκύψει από μη καθαρό Bis-GMA ή ως προϊόν αποδόμησης των Bis-GMA και Bis-DMA σύμφωνα με πολλούς ερευνητές (Olea και συν., 1996, Manabe 2000, Moon κ.ά., 2000, Pulgar κ.ά.). Έχει αναφερθεί ότι η BPA επιδεικνύει μια σειρά ανεπιθύμητων ενεργειών περιλαμβανομένης της οιστρογονικής και επαγόμενης απόπτωσης δραστηριότητας, της καρκινογένεσης και της μεταλλαξιγένεσης (Atkinson κ.ά., 2002, Terasaka κ.ά., 2005, Berge κ.ά., 2017). Το BPA ως ξeno-οιστρογόνο και ενδοκρινικός αναστολέας-παρεμποδιστής (disruptor) παρουσιάζει παρόμοια οιστρογονική δράση με τα φυσιολογικά οιστρογόνα αφού συνδεθεί με τους

ανθρώπινους οιστρογονικούς υποδοχείς (Polydourou 2018). Η ανίχνευση του BPA παραμένει ένα ζήτημα αμφιλεγόμενο μεταξύ των μελετών. Προκειμένου να προσδιοριστεί η BPA σε πολύ χαμηλά ποσοτικά όρια, απαιτείται πολύ ακριβής αναλυτική μέθοδος. Στην μελέτη μας η BPA εκλούστηκε από δύο υλικά, Conseal f και Helioseal, μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης. Το Helioseal έδειξε υψηλότερη συγκέντρωση από το Conseal f. Ανίχνευση BPA από οδοντιατρικά υλικά αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Olea και συν., 1996, Manabe 2000, Moon et al., 2000, Pulgar κ.ά., 2000, Al-Hiyasat κ.ά., 2004). Μερικοί συγγραφείς έχουν δείξει ότι η ανίχνευση της BPA μπορεί να είναι μια παρερμηνεία των κορυφών TEGDMA. Με τη χρήση του GC/MS αυτό το σφάλμα δεν μπορεί να συμβεί επειδή ο χρόνος ανίχνευσης και τα φάσματα μάζας αυτών των δύο συστατικών διαφέρουν πολύ μεταξύ τους (Geurtsen και συν., 1999). Συγκεκριμένα, στη μελέτη μας προσδιορίστηκε BPA σε $m/z=213$, $=228$ και $=119$, ενώ η TEGDMA στο $m/z=69$ και $=113$. Οι Geurtsen και συν. μελέτησαν την έκλυση μονομερών από τέσσερα ρητινώδη υλικά με τη χρήση GC/MS αλλά σε απεσταγμένο νερό και για χρόνο παρακολούθησης 24 ωρών και δεν έχουν ανιχνεύσει BPA. Η χρήση της μεθανόλης (η οποία είναι πιο επιθετική σε σύγκριση με το νερό) και ο μεγαλύτερος χρόνος ελέγχου φαίνεται ότι συνέβαλαν στην παρούσα μελέτη στην ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων BPA σε δύο από τα εξεταζόμενα υλικά.

Τα εμφρακτικά οπών και σχισμών είναι προληπτικά μέσα έναντι της τερηδόνας λόγω της ικανότητάς τους να απελευθερώνουν φθόριο. Πολλές πηγές φθορίου προτείνονται στη βιβλιογραφία, για παράδειγμα NaF (Swartz et al., 1976, Cooley et al., 1990), ύαλοι (Cook and Youngson 1989) και διαλυτά άλατα όπως YbF_3 (Dijkman et al., 1993) ή μεθακρυλοΐλ φθορίδιο (MP -) - μεθακρυλικό μεθύλιο (MMA) (Kadoma et al., 1982, Tanaka κ.ά., 1987). Στη μελέτη μας, το TBATFB ανιχνεύθηκε μόνο από το υλικό Clinpro. Το TBATFB προστίθεται στο πολυμερές πλέγμα για να απελευθερωθεί το φθόριο σε μια μακρά περίοδο, ενώ το υλικό συνεχίζει να διατηρεί τις φυσικές του ιδιότητες (Glasspoole και συν., 2001).

Τέλος, ένας άλλος σταθεροποιητής, τριφαινυλο-αντιμόνιο ή τριφαινυλο-στιβάνιο (TPSb) φάνηκε να εκλύεται μόνο από το Clinpro. Το TPSb συμμετέχει στη σύνθεση Bis-GMA (Geurtsen 1998) και έχει σχετιστεί με κυτταροτοξικές και γενετοξικές δράσεις (Heil και συν., 1996). Το TPSb ανιχνεύθηκε επίσης στις μελέτες που δημοσιεύθηκαν από τους Sprahl και συν 1998 και Michelsen και συν 2003.

Τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από επαφή με εκχυλίσματα εμφρακτικών οπών και σχισμών με βάση ρητίνη μειώθηκαν και στις δύο περιόδους παρατήρησης (24 ώρες και 72 ώρες) σε σύγκριση με την ομάδα των αρνητικών μαρτύρων. Φαίνεται να υπάρχει μια χρονική εξάρτηση καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε στις 72 ώρες παρακολούθησης. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί εξαιτίας του γεγονότος ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μονομερών εκκλύονται σε μεγαλύτερους χρόνους. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από υλικά που απελευθέρωσαν μεγαλύτερες ποσότητες TEGDMA. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι η TEGDMA είναι πιθανώς ο κύριος παράγοντας αιτίας των ανεπιθύμητων ενεργειών που οφείλονται στα εκχυλίσματα των Clinpro, Beautisalant και GrandioSeal κάτι που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία αλλά για διαφορετικά υλικά (Rawls και συν., 1992, Geurtsen et al., 1999).

Συμπεράσματα

- Η συνδυασμένη μέθοδος GC/MS φαίνεται να είναι κατάλληλη για την ανίχνευση και την αναγνώριση συστατικών που εκκλύονται από ρητινώδη οδοντιατρικά υλικά οπών και σχισμών .
- Η απελευθέρωση συστατικών από υλικά οπών και σχισμών εξαρτάται από τον τύπο/σύνθεση του υλικού και από το χρόνο ελέγχου.
- Όσο αυξάνεται ο χρόνος παραμονής του δείγματος στον οργανικό διαλύτη, αυξάνονται επίσης οι συγκεντρώσεις των συστατικών που ανιχνεύονται.
- Οι οργανικές ουσίες που ανιχνεύονται ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες συστατικών όπως μονομερή, εκκινητές, επιταχυντές, αναστολείς και σταθεροποιητές.
- Το κυρίαρχο μονομερές που βρέθηκε και στους δύο χρόνους ελέγχου σε όλα τα υλικά ήταν το TEGDMA.
- Η μεγαλύτερη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης παρατηρήθηκε στους μεγαλύτερους χρόνους ελέγχου και η μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση από τα τρία υλικά οπών και σχισμών από τα οποία εκλούστηκε μεγαλύτερη ποσότητα TEGDMA.

Βιβλιογραφία

- Ahovuo-Saloranta, a, Forss, H., 2013. Sealants for preventing dental decay in the permanent teeth. Cochrane Libr. 1–156. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001830.pub4>. Copyright
- Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., Elbetieha, A.M., 2004. Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur. J. Oral Sci.* 112, 267–272. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00136.x>
- Atkinson, J.C., Diamond, F., Eichmiller, F., Selwitz, R., Jones, G., 2002. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent. Mater.* 18, 128–135. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00031-8)
- Azarpazhooh, A., Main, P. a, 2008. Pit and fissure sealants in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. *J Can Dent Assoc* 74, 171–177.
- B. G. Sletten, G., Dahl, J., 2000. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol. Scand.* 57, 316–322.
- Becher, R., Kopperud, H.M., Al, R.H., Samuelsen, J.T., Morisbak, E., Dahlman, H.J., Lilleaas, E.M., Dahl, J.E., 2006. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent. Mater.* 22, 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.013>
- Beirut, N., Frencken, J.E., Van 't Hof, M.A., Van Palenstein Helder, W.H., 2006. Caries-preventive effect of resin-based and glass ionomer sealants over time: A systematic review. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 34, 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2006.00321.x>
- Berge, T.L.L., Lygre, G.B., J?nsson, B.A.G., Lindh, C.H., Bj?rkman, L., 2017. Bisphenol A concentration in human saliva related to dental polymer-based fillings. *Clin. Oral Investig.* 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2055-9>
- Bouillaguet, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T., Ciucchi, B., Holz, J., 1996. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J. Endod.* 22, 244–248. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80141-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80141-X)
- Cebe, M.A., Cebe, F., Cengiz, M.F., Cetin, A.Ri., Arpag, O.F., Ozturk, B., 2015. Elution of monomer from different bulk fill dental composite resins. *Dent. Mater.* 31, e141–e149. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.04.008>
- Cook, P.A., Youngson, C.C., 1989. A Fluoride-containing Composite Resin—An In Vitro Study of a New Material for Orthodontic Bonding. *Br. J. Orthod.* 16, 207–212. <https://doi.org/10.1179/bjo.16.3.207>

- Cooley, R.L., Mccourt, M.S.J.W., Huddleston, A.M., Casmedes, H.P., Poor, F., 1990. Evaluation of a fluoride-containing sealant by SEM , microleakage , and fluoride release. *Pediatr Dent* 12, 38–42.
- Dijkman, G.E., de Vries, J., Lodding, A., Arends, J., 1993. Long-term fluoride release of visible light-activated composites in vitro: a correlation with in situ demineralisation data. *Caries Res.* 27, 117–23.
- Durner, J., Schrickel, K., Watts, D.C., Ilie, N., 2015. Determination of homologous distributions of bisEMA dimethacrylates in bulk-fill resin-composites by GC-MS. *Dent. Mater.* 31, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.02.006>
- Ferracane, J.L., 1994. Elution of leachable components from composites. *J. Oral Rehabil.* 21, 441–452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1994.tb01158.x>
- Finer, Y., Jaffer, F., Santerre, J.P., 2004. Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. *Biomaterials* 25, 1787–1793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.029>
- Finer, Y., Santerre, J.P., 2004. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J. Dent. Res.* 83, 22–26. <https://doi.org/10.1177/154405910408300105>
- Furche, S., Hickel, R., Reichl, F.X., Van Landuyt, K., Shehata, M., Durner, J., 2013. Quantification of elutable substances from methacrylate based sealers and their cytotoxicity effect on with human gingival fibroblasts. *Dent. Mater.* 29, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.03.009>
- Gallorini, M., Cataldi, A., di Giacomo, V., 2014. HEMA-induced cytotoxicity: Oxidative stress, genotoxicity and apoptosis. *Int. Endod. J.* 47, 813–818. <https://doi.org/10.1111/iej.12232>
- Gerzina, T.M., Hume, W.R., 1994. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J. Oral Rehabil.* 21, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1994.tb01160.x>
- Geurtsen, W., 1998. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur. J. Oral Sci.* 106, 687–695. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1998.eos10602ii04.x>
- Geurtsen, W., Spahl, W., Leyhausen, G., 1999. Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 73–77.
- Glasspoole, E.A., Erickson, R.L., Davidson, C.L., 2001. A fluoride-releasing composite for dental applications. *Dent. Mater.* 17, 127–133. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00051-8)
- Göpferich, A., 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17,

- 103–114. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85755-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85755-3)
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, C.R., 1990. Cytotoxic effect of resin components on cultured mammalian fibroblast. *J.Dent.Res* 70, 1450–1455.
- Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U.E.H., Geurtsen, W., 1998. Effects of various resin composite (Co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J. Dent. Res.* 77, 60–67. <https://doi.org/10.1177/00220345980770010601>
- Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Leyhausen, G., Geurtsen, W., 1996. Genotoxicity of dental materials. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol.* 368, 181–194. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90060-9](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90060-9)
- Hensten-Pettersen, A., 1998. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. *Eur. J. Oral Sci.* 106, 707–712.
- Kadoma, Y., Masuhara, E., Anderson, J.M., 1982. Controlled Release of Fluoride Ions from Methacryloyl Fluoride-Methyl Methacrylate Copolymers. 2. Solution Hydrolysis and Release of Fluoride Ions. *Macromolecules* 15, 1119–1123. <https://doi.org/10.1021/ma00232a032>
- Komurcuoglu, E., Olmez, S., Vural, N., 2005. Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants in vitro. *J. Oral Rehabil.* 32, 116–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01405.x>
- Konieczna, A., Rutkowska, A., Rachoń, D., 2015. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.* 66, 5–11.
- Lempel, E., Czibulya, Z., Kovács, B., Szalma, J., Tóth, Á., Kunsági-Máté, S., Varga, Z., Böddi, K., 2016. Degree of conversion and BisGMA, TEGDMA, UDMA Elution from flowable bulk fill composites. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms17050732>
- Lewis, J.B., Rueggeberg, F. a, Lapp, C. a, Ergle, J.W., Schuster, G.S., 1999. Identification and characterization of estrogen-like components in commercial resin-based dental restorative materials. *Clin. Oral Investig.* 3, 107–113. <https://doi.org/10.1007/s007840050087>
- Li, Y.-C., Huang, F.-M., Lee, S.-S., Lin, R.-H., Chang, Y.-C., 2007. Protective effects of antioxidants on micronuclei induced by camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine employing in vitro mammalian test system. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 82B, 23–28. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30700>
- Llodra, J.C., Bravo, M., Delgado-Rodriguez, M., Baca, P., Galvez, R., 1993. Factors influencing the effectiveness of sealants - a meta-analysis. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 21, 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1993.tb00771.x>
- Malanin, K., 1993. Active sensitization to camphoroquinone and double active sensitization to acrylics with long-lasting patch test reactions. *Contact Dermatitis* 29, 284–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1993.tb03576.x>

- Małkiewicz, K., Wychowański, P., Olkowska-Truchanowicz, J., Tykarska, M., Wilczko, M., Czerwiński, M., Owoc, A., 2017. Uncompleted Polymerization and Cytotoxicity of Dental Restorative Materials as Potential Health Risk Factors. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 618–623. <https://doi.org/10.5604/12321966.1235159>
- Manabe, a, 2000. Detection of BPA in Dental Materials by Gas Chromatography-Mass Spectrometry 19, 75–86.
- Manojlovic, D., Radisic, M., Vasiljevic, T., Zivkovic, S., Lausevic, M., Miletic, V., 2011. Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dent. Mater.* 27, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.11.017>
- Michelsen, V.B., Lygre, H., Skålevik, R., Tveit, A.B., Solheim, E., 2003. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur. J. Oral Sci.* 111, 263–71. <https://doi.org/DOI 10.1034/j.1600-0722.2003.00033.x>
- Michelsen, V.B., Moe, G., Skålevik, R., Jensen, E., Lygre, H., 2007. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.003>
- Moin Jan, C., Nomura, Y., Urabe, H., Okazaki, M., Shintani, H., 2001. The relationship between leachability of polymerization initiator and degree of conversion of visible light-cured resin. *J. Biomed. Mater. Res.* 58, 42–6.
- Moon, H.J., Lim, B.S., Lee, Y.K., Kim, C.W., 2000. Determination of residual monomers in dental pit and fissure sealants using food/oral simulating fluids. *Bull. Korean Chem. Soc.* 21, 1115–1118.
- Müller, H., Olsson, S., Söderholm, K.J., 1997. The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites. *Eur. J. Oral Sci.* 105, 362–368.
- Nathanson, D., Lertpitayakun, P., Lamkin, M.S., Edalatpour, M., Chou, L.L., 1997. in Vitro Elution of Leachable Components From Dental Sealants. *J. Am. Dent. Assoc.* 128, 1517–1523. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1997.0091>
- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104, 298–305. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104298>
- Ortengren, U., Andreasson, H., Karlsson, S., Meding, B., Barregård, L., 1999. Prevalence of self-reported hand eczema and skin symptoms associated with dental materials among Swedish dentists. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 496–505. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1999.eos107612.x>
- Polydorou, O., 2018. Elution of Substances from Dental Composite Materials, in: Miletic,

- V. (Ed.), *Dental Composite Materials for Direct Restorations*. Springer International Publishing, Cham, pp. 179–195. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60961-4_12
- Polydorou, O., Hammad, M., König, A., Hellwig, E., Kümmerer, K., 2009a. Release of monomers from different core build-up materials. *Dent. Mater.* 25, 1090–1095. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.014>
- Polydorou, O., Huberty, C., Wolkewitz, M., Bolek, R., Hellwig, E., Kümmerer, K., 2012. The effect of storage medium on the elution of monomers from composite materials. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B, 68–74. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31923>
- Polydorou, O., König, A., Hellwig, E., Kümmerer, K., 2009b. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur. J. Oral Sci.* 117, 68–75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00594.x>
- Pongprueksa, P., De Munck, J., Duca, R.C., Poels, K., Covaci, A., Hoet, P., Godderis, L., Van Meerbeek, B., Van Landuyt, K.L., 2015. Monomer elution in relation to degree of conversion for different types of composite. *J. Dent.* 43, 1448–1455. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.10.013>
- Pulgar, R., Olea-Serrano, M.F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J.M., Olea, N., 2000. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from Bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ. Health Perspect.* 108, 21–27. <https://doi.org/10.1289/ehp.108-a545>
- Rawls, H.R., Marshall, M. V, Cardenas, H.L., Bhagat, H.R., Cabasso, I., 1992. Cytotoxicity evaluation of a new radiopaque resin additive--triphenyl bismuth. *Dent. Mater.* 8, 54–9.
- Rothmund, L., Shehata, M., Van Landuyt, K.L., Schweikl, H., Carell, T., Geurtsen, W., Hellwig, E., Hickel, R., Reichl, F.X., Högg, C., 2015. Release and protein binding of components from resin based composites in native saliva and other extraction media. *Dent. Mater.* 31, 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.01.016>
- Ruyter, I.E., 1981. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odontol. Scand.* 39, 27–32. <https://doi.org/10.3109/00016358109162255>
- Schweikl, H., Altmannberger, I., Hanser, N., Hiller, K.-A.A., Bolay, C., Brockhoff, G., Spagnuolo, G., Galler, K., Schmalz, G., 2005. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 26, 4111–4118. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.026>
- Seiss, M., Langer, C., Hickel, R., Reichl, F.X., 2009. Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *Arch. Toxicol.* 83, 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0470-7>

- Sideridou, I.D., Achilias, D.S., 2005. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 74, 617–626. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30252>
- Simonsen, R.J., 1991. Retention and effectiveness of dental sealant after 15 years. *J. Am. Dent. Assoc.* 122, 34–42. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1991.0289>
- Simonsen, R.J., Neal, R.C., 2011. A review of the clinical application and performance of pit and fissure sealants. *Aust. Dent. J.* 56, 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01295.x>
- Spahl, W., Budzikiewicz, H., Geurtsen, W., 1998. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Dent.* 26, 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00086-3)
- Suzuki, K., Ishikawa, K., Sugiyama, K., Furuta, H., Nishimura, F., 2000. Content and release of bisphenol A from polycarbonate dental products. *Dent. Mater. J.* 19, 389–95.
- Swartz, M.L., Phillips, R.W., Norman, R.D., Eliason, S., Rhodes, B.F., Clark, H.E., 1976. Addition of Fluoride to Pit and Fissure Sealants-A Feasibility Study. *J. Dent. Res.* 55, 757–771. <https://doi.org/10.1177/00220345760550050901>
- Tanaka, K., Taira, M., Shintani, H., Wakasa, K., Yamaki, M., 1991. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J. Oral Rehabil.* 18, 353–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1991.tb00067.x>
- Tanaka, M., Ono, H., Kadoma, Y., Imai, Y., 1987. Incorporation into Human Enamel of Fluoride Slowly Released from a Sealant in vivo. *J. Dent. Res.* 66, 1591–1593. <https://doi.org/10.1177/00220345870660101601>
- Tarumi, H., Imazato, S., Narimatsu, M., Matsuo, M., Ebisu, S., 2000. Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *J. Dent. Res.* 79, 1838–1843. <https://doi.org/10.1177/00220345000790110401>
- Terasaka, H., Kadoma, Y., Sakagami, H., Fujisawa, S., 2005. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 25, 2241–2247.
- Van Landuyt, K.L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B., 2007. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 28, 3757–3785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>
- Yamaki, K., Taneda, S., Yanagisawa, R., Inoue, K. ichiro, Takano, H., Yoshino, S., 2007. Enhancement of allergic responses in vivo and in vitro by butylated hydroxytoluene.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 223, 164–172.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.007>

Yoshida, K., Matsumura, H., Tanaka, T., Atsuta, M., 1992. The relationship between monomer composition and physical properties of light-cured opaque resin. *Dent. Mater.* 8, 137–139. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(92\)90069-O](https://doi.org/10.1016/0109-5641(92)90069-O)

<i>ΥΛΙΚΟ</i>	<i>ΕΤΑΙΡΕΙΑ</i>	<i>ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ</i>	<i>ΣΥΝΘΕΣΗ</i>	<i>%κ.β</i>
CLINPRO SEALANT	3M ESPE	N865322	TRIETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE (TEGDMA)	40-50
			BISPHENOL A DIGLYCIDYL ETHER DIMETHACRYLATE (BISGMA)	40-50
			SILANE TREATED SILICA	5 -10%
			TETRABUTYLAMMONIUM TETRAFLUOROBORATE	<5
			DIPHENYLIODONIUM HEXAFLUOROPHOSPHATE	<1
			TRIPHENYLANTIMONY	<0,5
			ETHYL 4-DIMETHYL AMINO BENZOATE (EDMAB)	<0,5
			TITANIUM DIOXIDE	<0,5
			HYDROQUINONE	<0,05
CONSEAL F	SDI	160139	URETHRANE DIMETHACRYLATE	50-70
			TRIETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE	30-40
HELIOSEAL CLEAR	IVOCLEAR VIVADENT	V16218	BIS-GMA	50-100
			TRIETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE	25-50
GRANDIO SEAL	VOCO	1713494	TRIETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE	10-25%
			FUMED SILICA	5-10%
			BIS-GMA	2,5-5
BEAUTISEALANT	SHOFU	91676	Glass powder	30
			UDMA	
			TEGDMA	

Πίνακας 1. Σύνθεση των υλικών σύμφωνα με τα Δελτία ασφάλειας των υλικών (Material Safety Data Sheets).

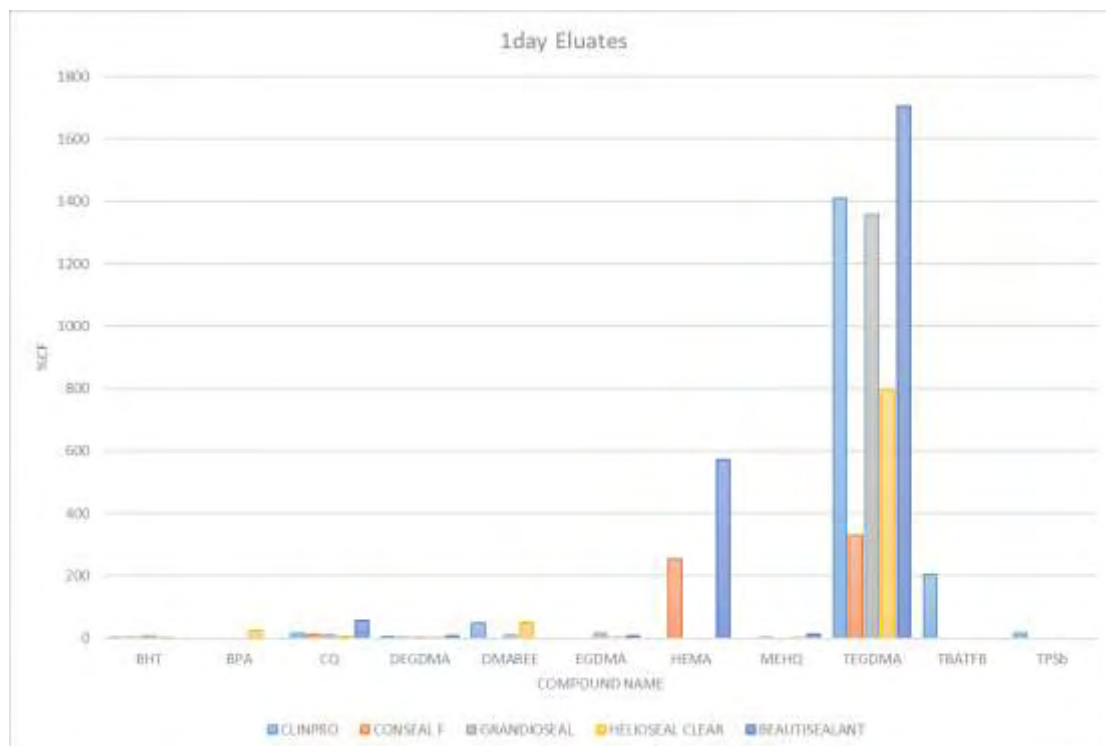
Υλικό	Συστατικό	%CF 1ημέρα	%CF 40 ημέρες
Clinpro	BHT	1,74±1,32	10,98±3,1
	BPA	—	—
	CQ	15,27±12,87	83,96±27,12
	DEGDMA	5,64±3,13	4,03±0,71
	DMABEE	48,95±32,03	2,91,32±42,83
	EGDMA	—	7,94±9,84
	HEMA	—	—
	MEHQ	—	—
	TEGDMA	1409,66±771,35	1296,03±244,55
	TBATFB	204,4±135,77	1051,64±282,85
Conseal f	TPSb	15,54±12,15	153,58±23,99
	BHT	0,67±0,05	13,25±5,82
	BPA	—	3,83±4,5
	CQ	11,6±1,1	106,29±73,6
	DEGMA	0,65±0,07	1,39±0,63
	DMABEE	—	—
	EGDMA	—	—
	HEMA	253,48±33,5	674,54±356,21
	MEHQ	0,9±0,07	6,87±1,54
	TEGDMA	330,58±53,91	674,46±278,66
Grandio Seal	TBATFB	—	—
	TPSb	—	—
	BHT	7,61±4,71	12,02±5,41
	BPA	—	—
	CQ	8,57±5,35	10,07±4,6
	DEGMA	1,16±0,68	0,35±0,25
	DMABEE	8,55±6,71	17,54±11,94
	EGDMA	14,49±0,07	22,39±6,61
	HEMA	—	—
	MEHQ	—	—
Helioseal Clear	TEGDMA	1357,18±567,36	1435,607±487,22
	TBATFB	—	—
	TPSb	—	—
	BHT	0,28±0,03	1,21±0,74
	BPA	22,58±2,31	7,96±3,15
	CQ	4,69±0,49	22,04±13,23
	DEGDMA	1,43±0,44	1,14±0,84
	DMABEE	50,1±5,66	242,78±77,22
	EGDMA	2,59±1,28	33,99±63,47
	HEMA	—	—
BeautiSealant	MEHQ	0,18±0,09	1,86±0,86
	TEGDMA	796,56±194,63	845,41±257,59
	TBATFB	—	—
	TPSb	—	—
	BHT	—	2,88±1,46
	BPA	—	—
	CQ	55,08±48,08	77,22±33,25
	DEGDMA	8,52±2,8	1,94±0,92
	DMABEE	—	—
	EGDMA	6,33±3,51	142,81±120,23
	HEMA	572,13±231,71	266,77±81,82
	MEHQ	13,27±2,21	28,86±4,16
	TEGDMA	1704,18±709,41	631,1±217,8
	TBATFB	—	—
	TPSb	—	—
	—	—	—

Πίνακας 2. Συστατικά που ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποίηση τους.

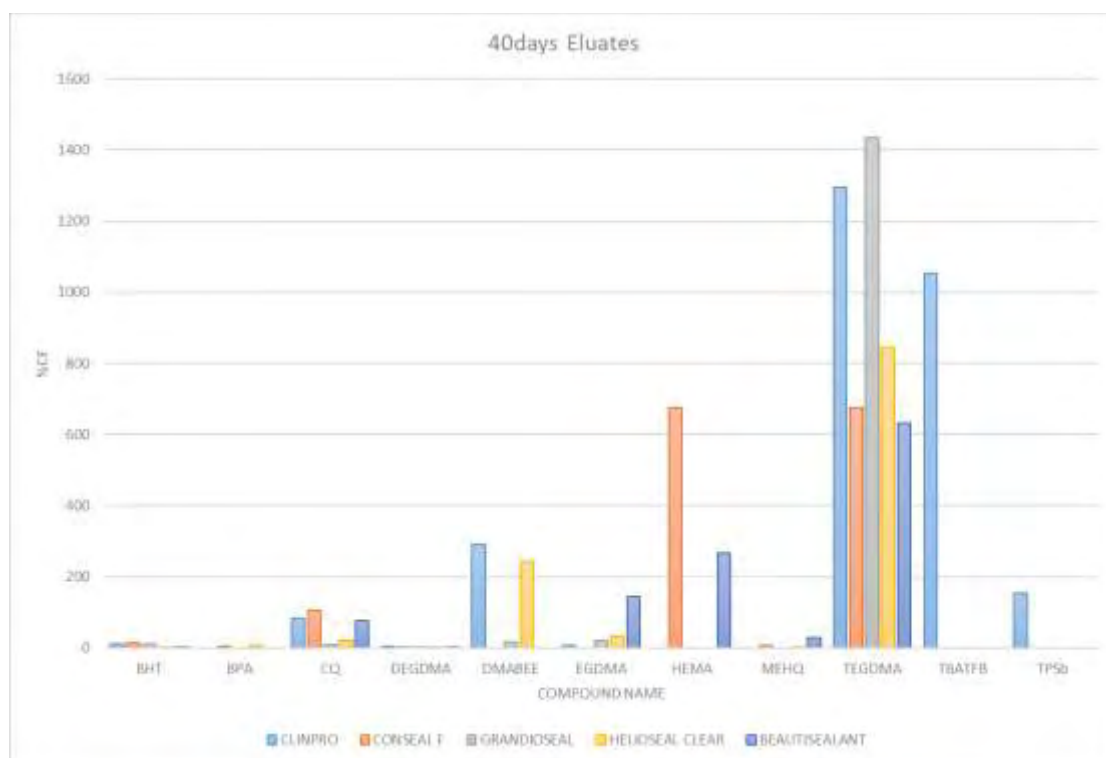
Υλικό	24h*	72h*
<i>BeautiSealant</i>	33 ± 1.3 ^a	23 ± 2.3 ^b
<i>Clinpro</i>	41 ± 1.7 ^a	32 ± 1.1 ^b
<i>Conseal F</i>	68 ± 1.2 ^A	60 ± 1.0 ^B
<i>Grandio Seal</i>	35 ± 1.6 ^a	22 ± 1.5 ^b
<i>Helioseal Clear</i>	75 ± 2.0 ^A	59 ± 2.4 ^B

*Mean value ± Standard Deviation. Different superscript letters indicate statistical significant difference of samples (p<0.05).

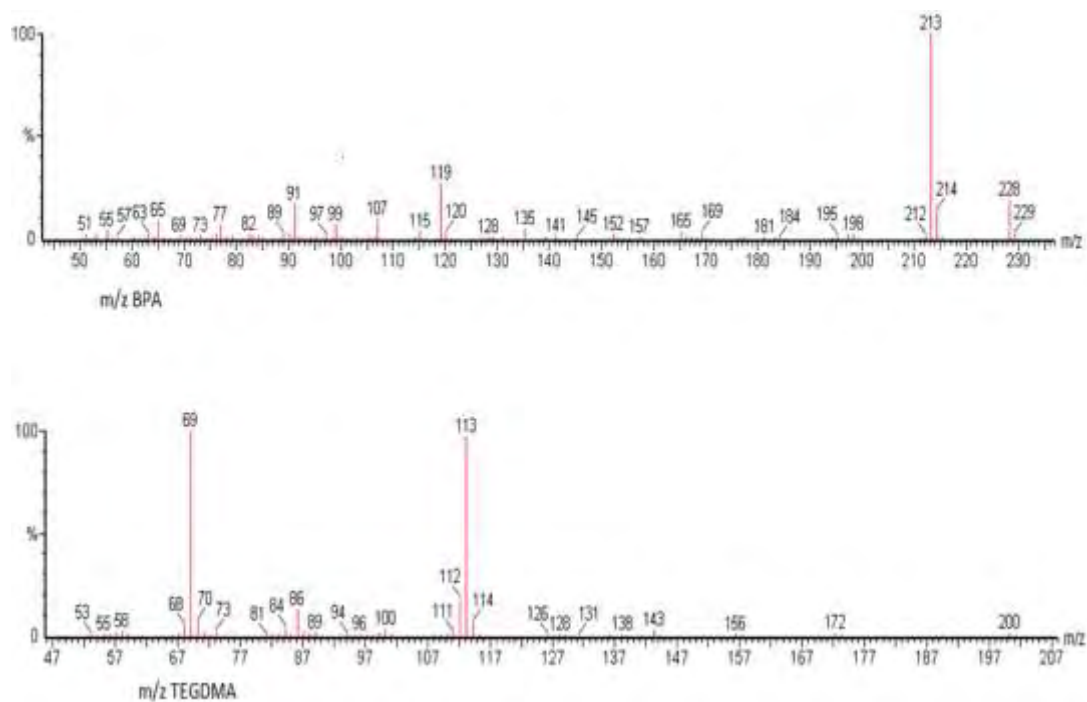
Πίνακας 3. Επίδραση στην κυτταρική επιβίωση κυττάρων NIH/3T3 μετά από την έκθεσή τους σε 100mg/τρυβλίο στα εξεταζόμενα υλικά για 24 και 72 ώρες.



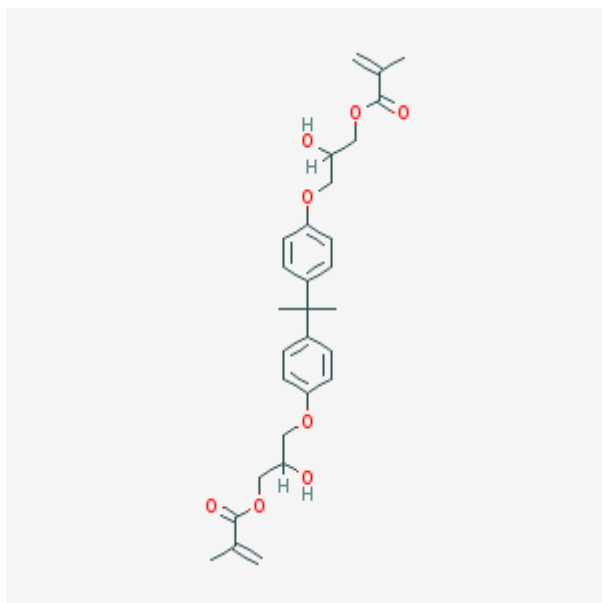
Σχήμα 1. Διάγραμμα των συστατικών που ανιχνεύθηκαν μετά από έκλυση 1 ημέρας.



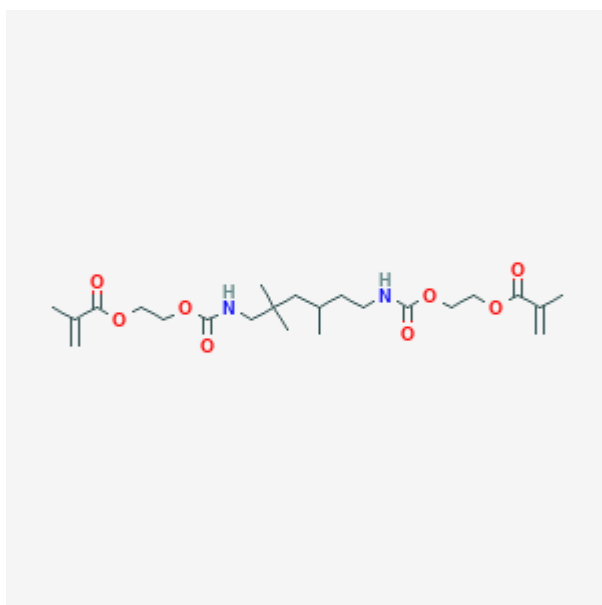
Σχήμα 2. Διάγραμμα των συστατικών που ανιχνεύθηκαν μετά από έκλουση 40 ημερών.



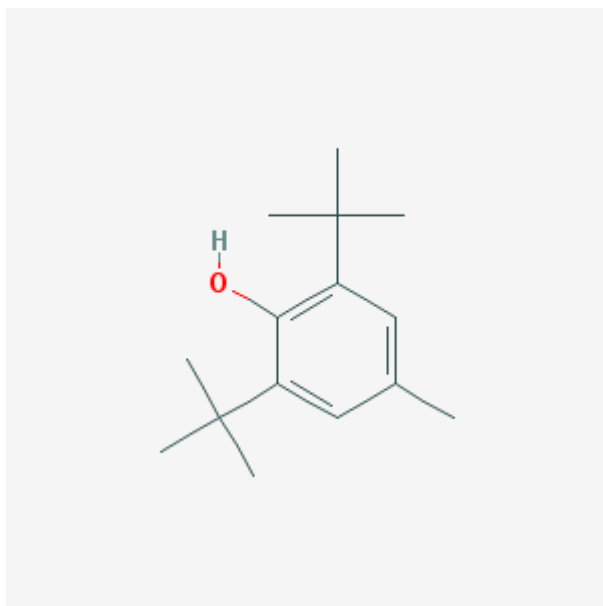
Σχήμα 3. Απεικόνιση (m/z) για BPA and TEGDMA.



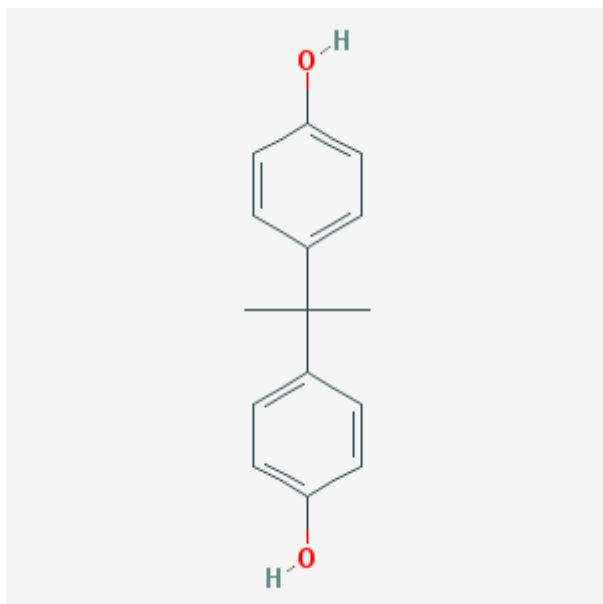
Σχήμα 4. Bis-GMA



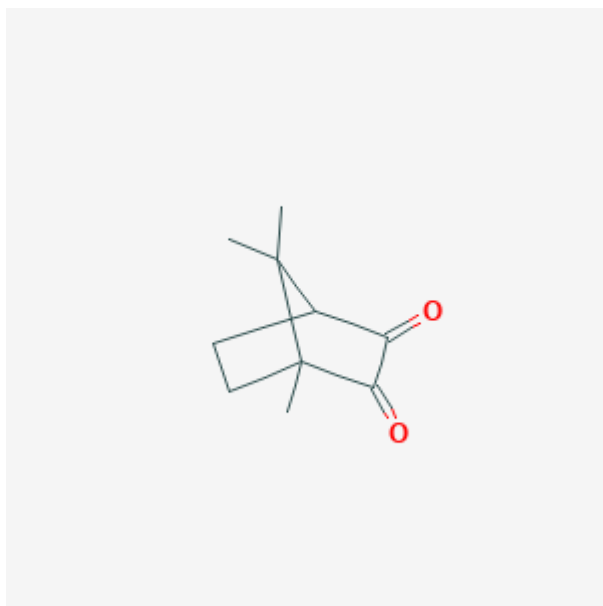
Σχήμα 5. UDMA



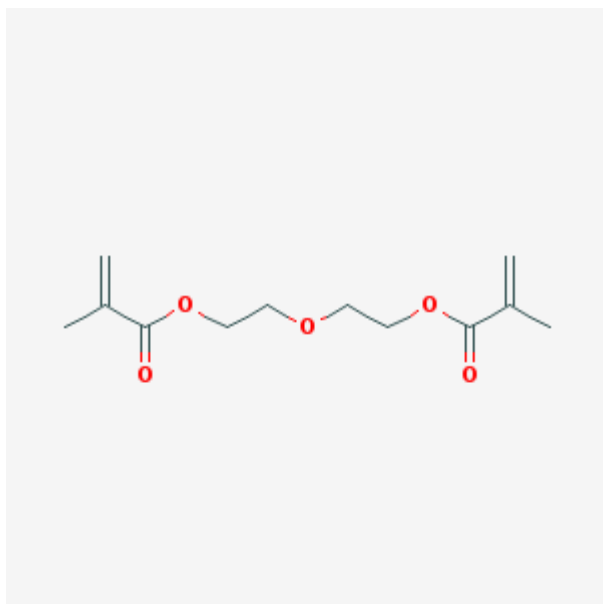
Σχήμα 6. BHT



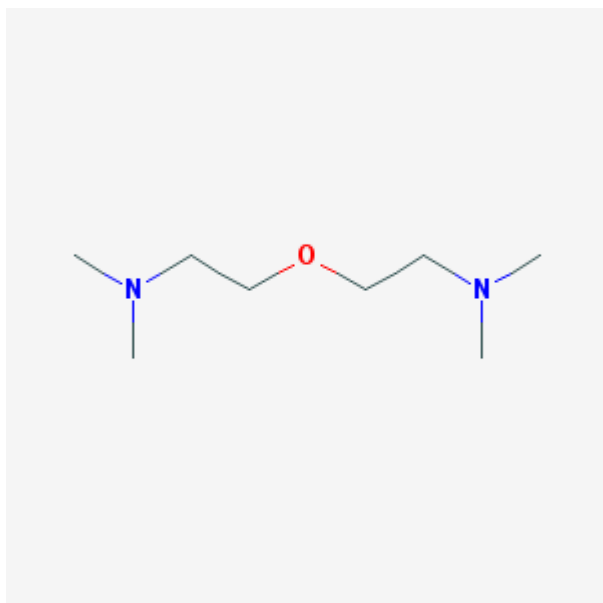
Σχήμα 7. BPA (Bis-phenol-A)



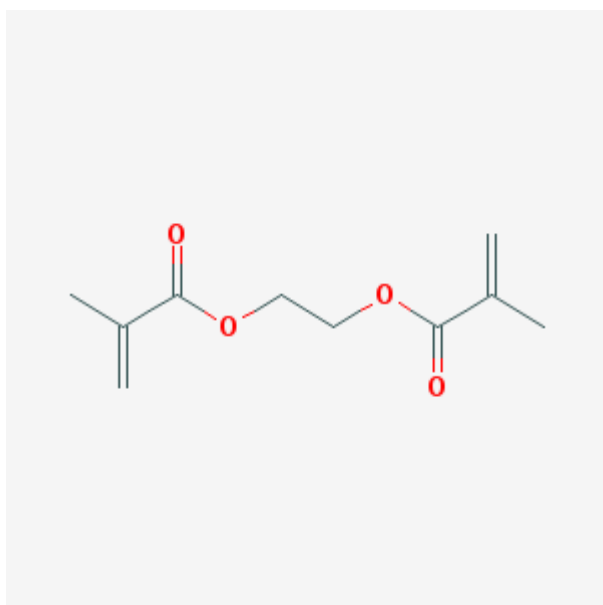
Σχήμα 8. CQ (Camphorquinone)



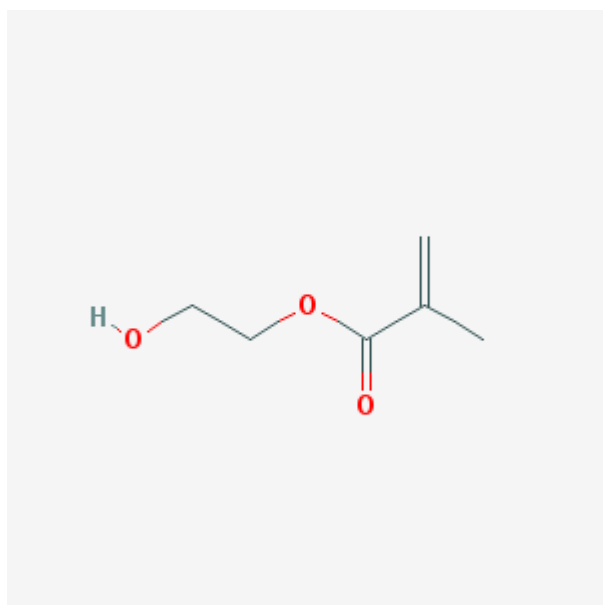
Σχήμα 9. DEGDMA



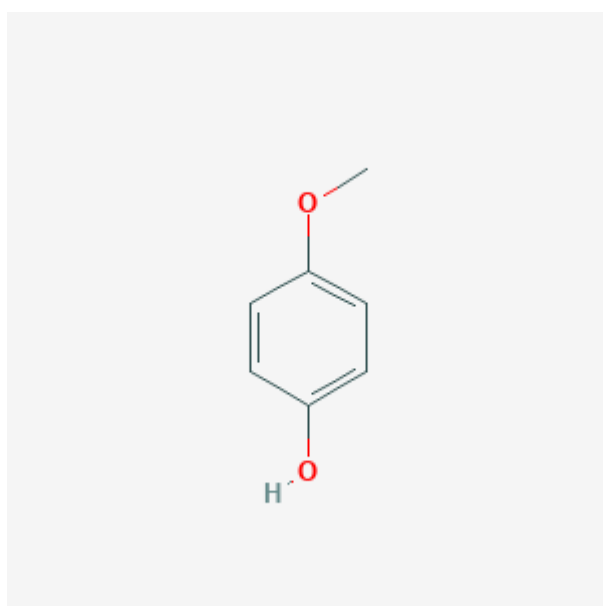
Σχήμα 10. DMABEE



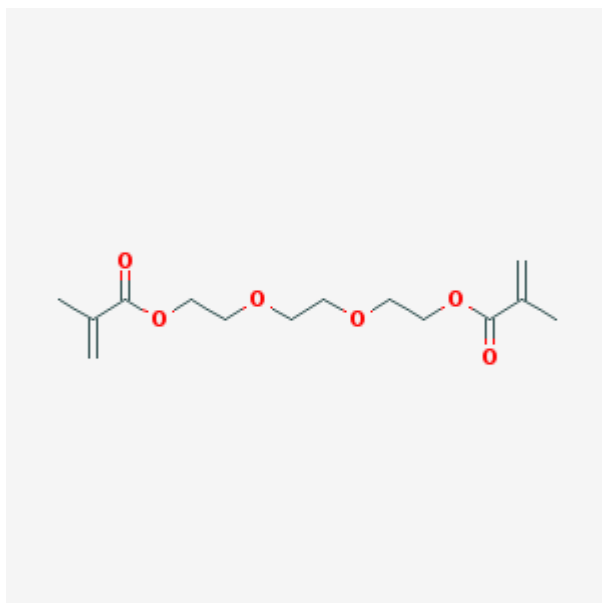
Σχήμα 11. EGDMA



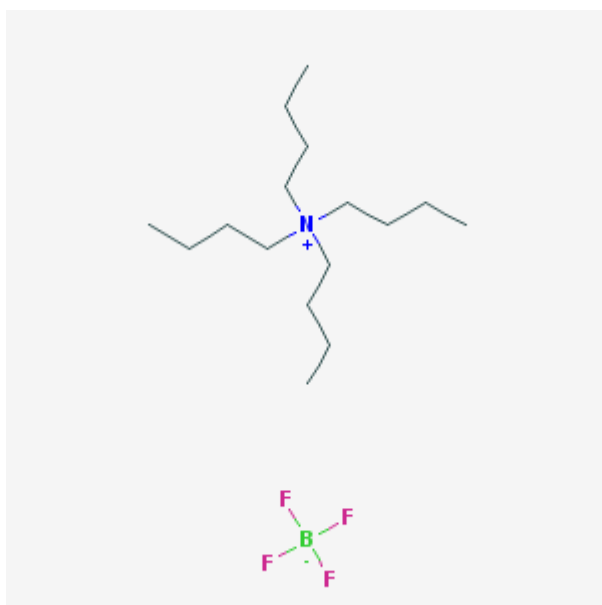
Σχήμα 12. HEMA



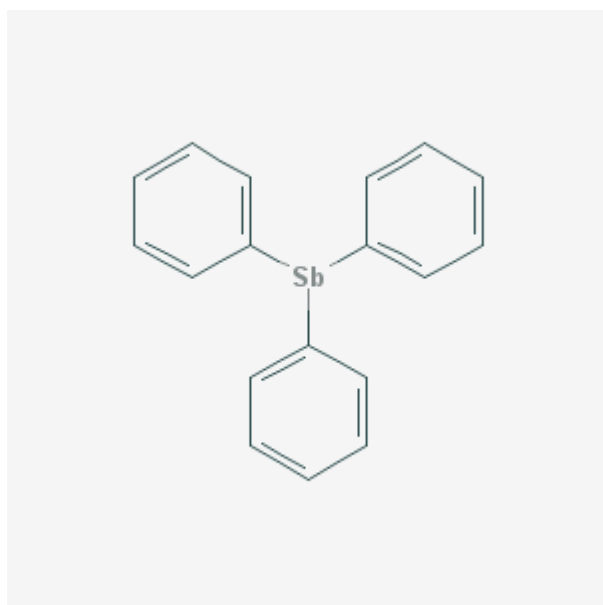
Σχήμα 13. MEHQ



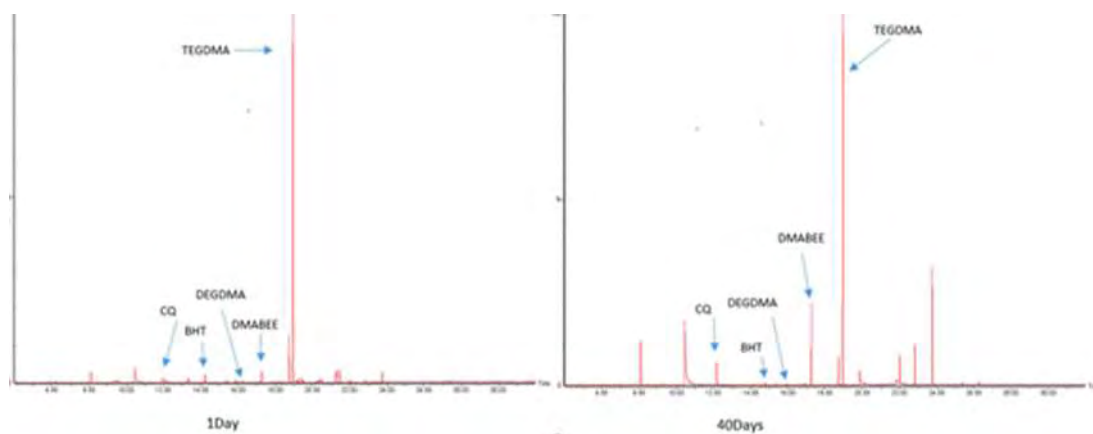
Σχήμα 14. TEGDMA



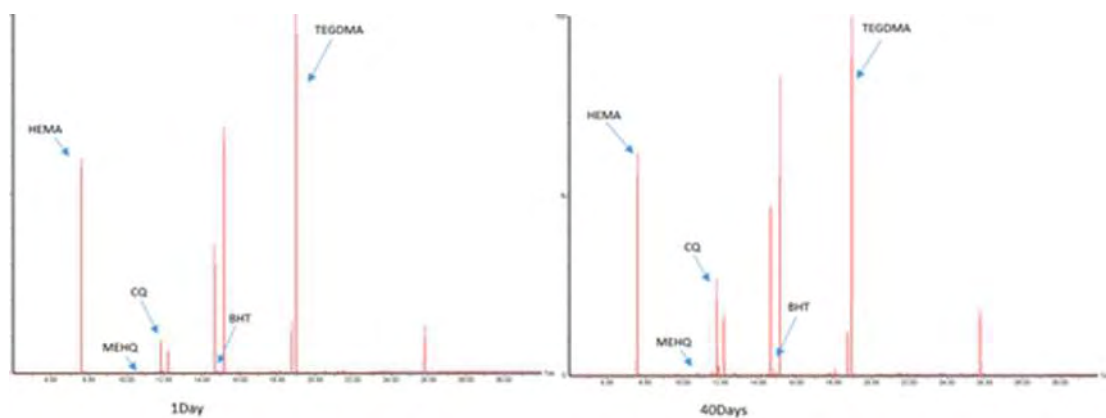
Σχήμα 15. TBATFB



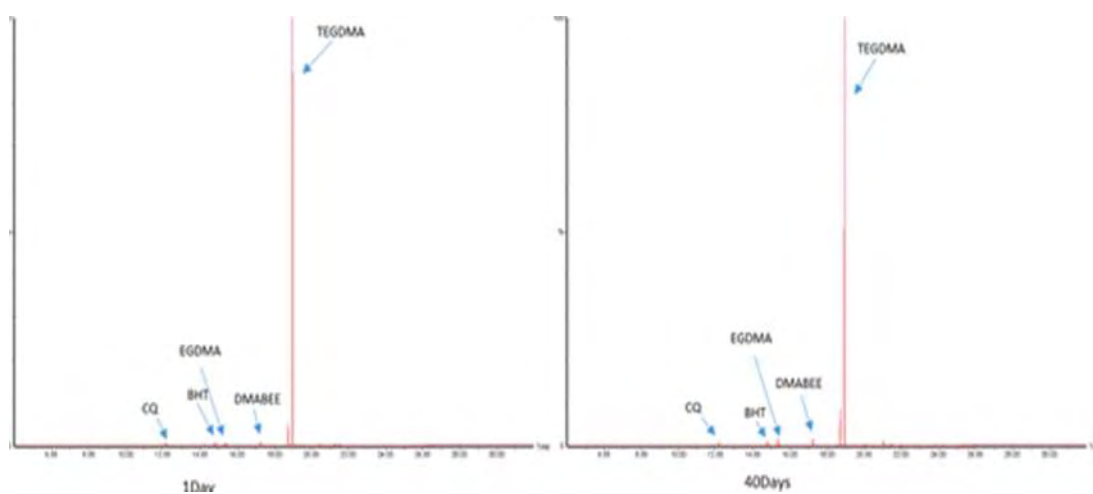
Σχήμα 16. TPSb



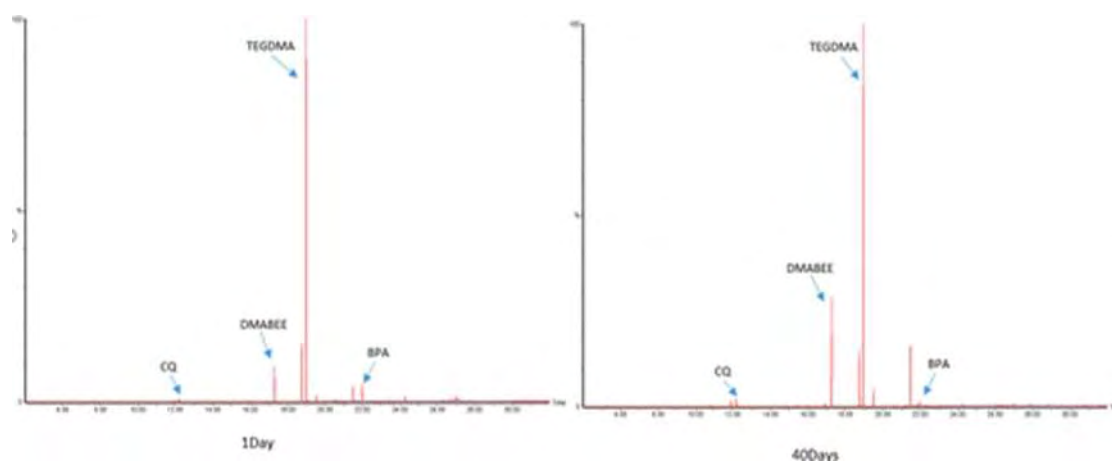
Σχήμα 17. Χρωματογραφήματα από το Clinpro Sealant στους 2 χρόνους ελέγχου.



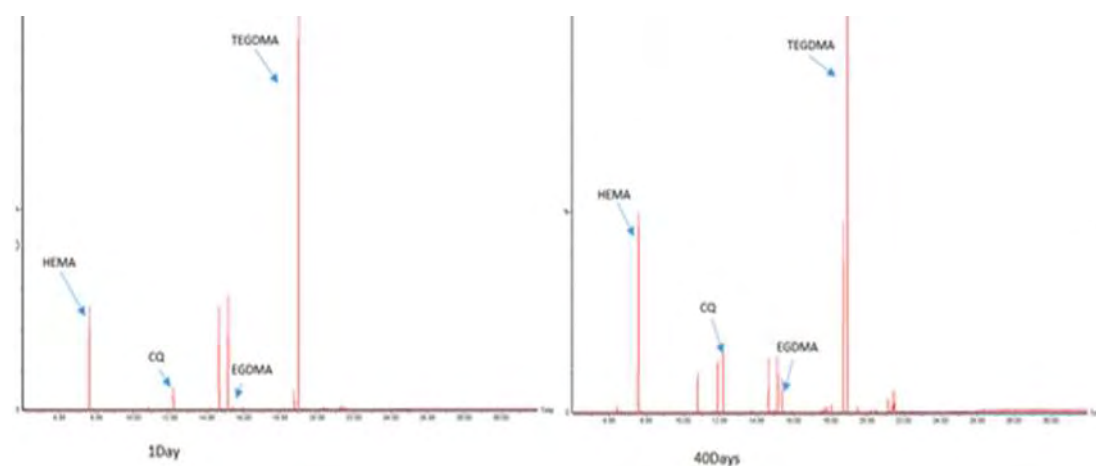
Σχήμα 18. Χρωματογραφήματα από το ConSeal f στους 2 χρόνους ελέγχου.



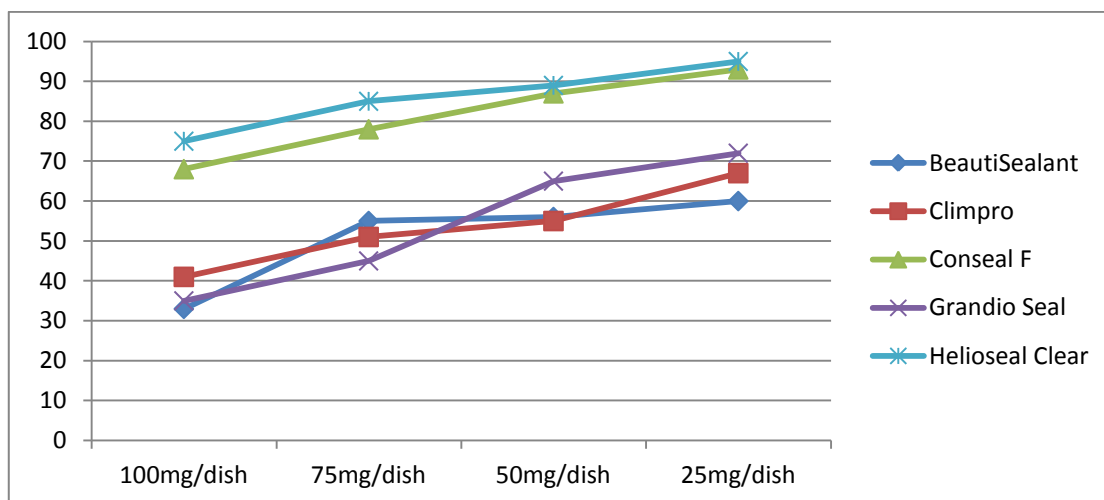
Σχήμα 19. Χρωματογραφήματα από το Grandio Seal στους 2 χρόνους ελέγχου.



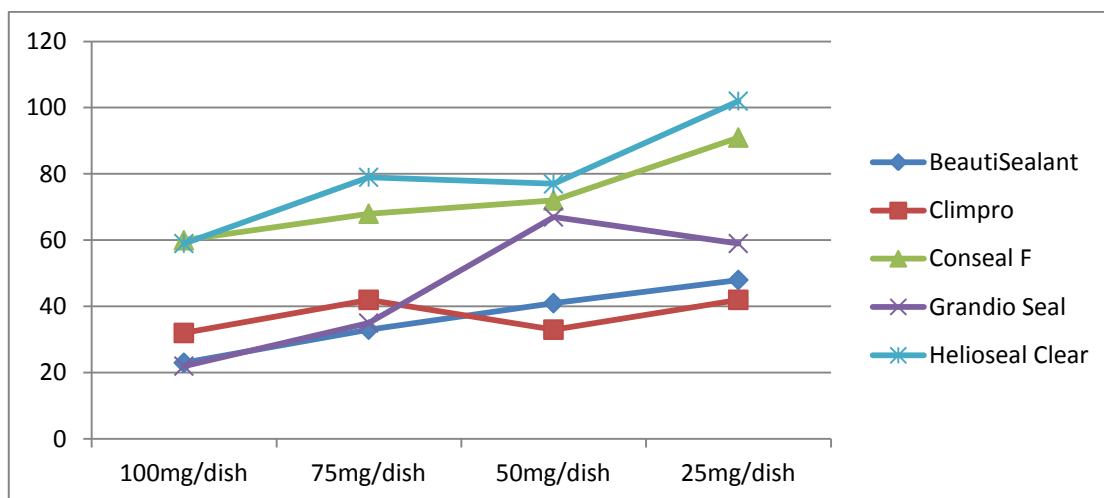
Σχήμα 20. Χρωματογραφήματα από το Helioseal Clear στους 2 χρόνους ελέγχου.



Σχήμα 21. Χρωματογραφήματα από το Beautisealant στους 2 χρόνους ελέγχου.



Σχήμα 22. Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων NIH3T3 μετά από 24 ώρες έκθεσής τους σε 25-100 mg/τρυβλίο των υλικών που εξετάστηκαν.



Σχήμα 23. Καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων NIH3T3 μετά από 72 ώρες έκθεσής τους σε 25-100 mg/τρυβλίο των υλικών που εξετάστηκαν.